

UNIVERSIDAD DE PANAMA

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología
Programa de Maestría en Ciencias Biológicas

PREVALENCIA DE GENOTIPOS ENCONTRADOS EN
MUESTRAS POSITIVAS POR VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO EN MUJERES PANAMEÑAS DE 15 A 60 AÑOS

Lina Margarita Solis Castillero

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS CON
ORIENTACION EN GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

ASESOR DR JUAN MIGUEL PASCALE MD Ph D

PANAMA REPUBLICA DE PANAMA

2009



Vicerrectoria de Investigacion y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnologia
Programa de Maestria en Ciencias Biologicas

TESIS

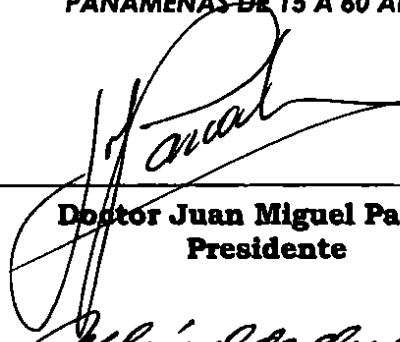
Sometida para optar al titulo de Maestria en Ciencias Biologicas
con Orientacion en Genetica y Biologia Molecular

Estudiante LINA M SOLIS CASTILLERO Cedula 6 51 2458


Titulo de la Tesis

**"PREVALENCIA DE GENOTIPOS EN MUESTRAS POSITIVAS PARA VIRUS PAPILOMA HUMANO EN MUJERES
PANAMENAS DE 15 A 60 AÑOS"**

PROBADO POR



Doctor Juan Miguel Pascale
Presidente




Doctora Magali de Chial
Miembro

Miembro



Magister Brenda de Mayorga

EFRENDADO POR.



**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA.

28 de mayo de 2009

Dedicatoria

Con la presentacion de este trabajo culmina con uno de mis retos personales sin la guia y proteccion de Dios no lo hubiese podido alcanzar por lo que le dedico este trabajo principalmente a el

A mis queridas hijas Lina Mariana y Valeria Isabel quienes muchas veces me han dado aliento para continuar a mi querido esposo Mano por todo su apoyo amor y compresion en todos estos anos A mis padres hermanos y demas familiares que siempre han creido en mi y me han apoyado en todos mis proyectos

Agradecimiento

Quisiera agradecer a todos y cada una de las personas que de una u otra manera ayudaron a cristalizar este trabajo. A los colegas del laboratorio de Genómica y Proteómica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, en especial al Dr. Juan Miguel Pascale, Lic. Juan Castillo, Lic. Yaxelis Mendoza, Lic. Yamitzel Zaldívar y demás personal tanto administrativo como del laboratorio, quienes en todo momento me brindaron su ayuda.

A todos los que laboran en el Laboratorio Genetix, que con su paciencia y comprensión me ayudaron en los momentos en que salí a realizar los análisis de este estudio.

Al Dr. Efraim Barreiro y las enfermeras ginecológicas del Centro de Salud de Pueblo Nuevo, quien sin ningún tipo de interés nos ayudaron con la toma de las muestras de ese centro.

A las personas que laboran en los diferentes Centros de Salud, que desinteresadamente tomaron muestras para este estudio y sobre todo a las pacientes que confiaron en nosotros.

A todos los profesores, asistentes y personal administrativo del Programa de Maestría de Ciencias Biológicas de la Universidad de Panamá, por todas sus enseñanzas.

A mis compañeros de estudios por todos los momentos de alegría, nerviosismo, angustia y de triunfos compartidos.

INDICE GENERAL

Resumen del proyecto	1
Summary of the Project	2
Introduccion	3
Justificacion	8
Objetivos	10
Papillomaviridae	11
Generalidades	12
Taxonomia	13
Morfologia	15
Genoma	16
Hospederos	19
Aves	19
Mamiferos	19
Humanos	21
Mecanismos de infeccion	27
Prevalencia de VPH en Cancer Cervico Uterino	30
Epidemiologia de la infeccion por VPH	32
Clasificacion de genotipos de VPH	35
Mecanismo de transformacion a lesiones malignas	39
Prevalencia de genotipos de VPH	43

Factores de predisposicion a adquirir infecciones por VPH	45
Prevencion de las infecciones por VPH	50
Metodos de deteccion de las infecciones por VPH	52
Citomorfologicas	52
Tecnicas Moleculares	54
a Captura Hibrida	54
b Cebadores consenso	55
Pacientes materiales y metodos	60
Diseno del estudio	61
Seleccion de Participantes	62
Criterios de Inclusion y Exclusion	63
Consentimiento informado y Consideraciones Eticas	64
Entrevista de las participantes	65
Procedimientos para garantizar aspectos eticos en las investigaciones con sujetos humanos	66
Metodos	67
Extraccion de ADN	68
Cuantificacion del ADN	70
Amplificacion del ADN de las muestras	71
Control de Calidad	72
Amplificacion del ADN por PCR con cebadores SFP ₁₀	73
Visualizacion con Agarosa al 3%	74
Fase de DEIA (DNA Enzyme InmunoAssay)	75

Hibridacion Reversa	76
Verificacion de las muestras negativas	77
Resultados obtenidos	78
Muestras del estudio	79
Analisis de muestras positivas para infeccion por VPH	84
Factores de riesgo en las pacientes positivas	85
Resultados de genotipos especificos encontrados	88
Resultados de la verificacion de las muestras negativas	90
Discusion	91
Conclusion	97
Recomendaciones	100
Bibliografia Consultada	102
Anexos	110
Consentimiento informado	111
Encuesta aplicada a las participantes	112
Evaluacion de los encuestadores	117

INDICE DE FIGURAS

Fig 1	Clasificación Baltimore de los Virus	13
Fig 2	Arbol taxonomico de los virus	14
Fig 3	Representacion del Virus del Papiloma Humano	15
Fig 4	Representacion del genoma del virus del Papiloma Humano	17
Fig 5 a y b	Funcion de los genes del VPH	18
Fig 6	Perro con verruga bucal	20
Fig 7	Conejo infectado con VPH	20
Fig 8	Paciente con verruga comun tipo cuerno	22
Fig 9	Paciente con verrugas en forma de coliflor	22
Fig 10	Representacion esquematica de una verruga de la piel causada por el Virus del Papiloma	23
Fig 11 a y b	Verrugas genitales en vulva y pene	23
Fig 12	Pacientes con Epidermodisplasia Verruciformes	24
Fig 13	Numero de casos de diferentes tipos de cancer relacionados al VPH	26
Fig 14	Ciclo de vida del Virus del papiloma humano	26
Fig 15	Expresion de los genes virales en una infeccion por VPH	29
Fig 16	Clasificacion Epidemiologica y Filogenetica de los diferentes tipos de VPH	36
Fig 17	Tipos de VPH relacionados a afecciones en los humanos	38

Fig 18	Ciclo de infeccion del VPH	40
Fig 19	Esquema de la progresion de las infecciones por VPH	41
Fig 20	Mapa de la RLC del VPH tipo 18	42
Fig 21	Metodo citologico para determinacion del VPH	53
Fig 22	Esquema de sitio de anidacion en el genoma del VPH, de los diferentes cebadores disponibles en el mercado	58
Fig 23	Esquema de tecnica de PCR SFP ₁₀ e hibridacion reversa	59
Fig 24	Tubo con la muestra tomada en el pabillo al que se le agrego solucion salina fisiologica	69
Fig 25	Microtubo de 1.5 ml con celulas descamadas del cuello del utero de una de las participantes suspendidas en solucion salina fisiologica	69
Fig 26	Biophotometer de Eppendorf	70
Fig 27	Equipo utilizado para la cuantificacion del ADN obtenido	70
Fig 28	Distribucion de los centros de procedencia de las participantes	79
Fig 29	Distribucion de pacientes por grupo etareo	80
Fig 30	Numero de compañeros sexuales de las participantes	81
Fig 31	Tipo de canceres familiares que declararon las participantes	81
Fig 32	Distribucion por ingreso economico familiar de las pacientes	82
Fig 33	Relacion de mujeres fumadoras vs la no fumadoras	82
Fig 34	Representacion de aquellas mujeres que cocinaron con leña vs las que no	83
Fig 35	de una de las corridas de los amplimeros de SFP ₁₀ en agarosa 3%	84
Fig 36	Numero de parejas sexuales de las pacientes positivas para VPH	85

Fig 37 Porcentaje de pacientes positivas por grupo de edad	86
Fig 38 Prevalencia edad específica de pacientes positivas para VPH	87
Fig 39 Tiras de RHA mostrando bandas para los genotipos encontrados	89
Fig 40 Productos de amplificación de la β Globina	90

INDICE DE CUADROS

Cuadro I	Distribucion por edad de las participantes de este estudio	80
Cuadro II	Distribucion de los genotipos encontrados	88

ABREVIATURAS

VPH Virus del Papiloma Humano

ADN ácido desoxirribonucleico

PAP Tinción de Papanicolaou

LIPA Line Probe assay por sus siglas en inglés prueba en línea

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

DEIA DNA Enzyme Immuno Assay

CNBI Comité Nacional de Bioética

pb pares de bases

RHA Reverse hybridization assay por sus siglas en inglés

ELISA Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay por sus siglas en inglés

RESUMEN

Las muertes por tumores malignos son la primera causa de defunción en Panamá y las causadas por tumores del cuello de útero se encuentran en quinta posición. Mundialmente se reportan tasas de mortalidad de 500 000 por año 80% de las cuales ocurren en países en desarrollo. En Centro América, la incidencia es aproximadamente 5 veces la de Europa Occidental. Algunos tipos de Virus de Papiloma Humano se encuentran en un 99% en hiperplasias del cuello del útero. No se tienen datos acerca de la prevalencia de VPH ni de los genotipos presentes en la población panameña. Se estudiaron 200 mujeres panameñas de nivel socioeconómico bajo, medio y alto de entre 15 y 60 años o más las cuales acudieron a las clínicas de control y tamizaje de la prueba de Papanicolaou, que voluntariamente aceptaron participar y firmaron un consentimiento informado. Se les tomó una muestra de raspado cervical para detectar VPH mediante el uso de técnicas moleculares de PCR a través de los cebadores SFP₁₀ y LIPA (Line Immuno Probe Assay) para determinar la presencia del genoma del VPH y la prevalencia específica para cada grupo de edad para 25 diferentes genotipos de VPH incluyendo los 14 principales tipos de VPH carcinogénicos (VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). De las 200 pacientes 102 fueron positivas la prevalencia de VPH en la población estudiada fue del 51% y determino que la misma se daba con un modelo de dos picos: uno en mujeres jóvenes de 20 a 24 años (53%), de 25 a 29 años (59%) y luego 55 a 59 años en un (83%) y más de 60 años (70%). Se encontraron 235 tipos diferentes el tipo 52 fue el más prevalente (21%) seguido del 31 (12%), 6 (10%), 16 (7%), 33 (7%).

SUMMARY

Deaths from malignant tumors are the leading cause of death in Panama and those caused by tumors of the cervix are number 5. Globally reported mortality rates of 500 000 per year, 80% of which occur in developing countries. In Central America, the incidence is about 5 times that of Western Europe. Some types of HPV are at a 99% in hyperplasia of the cervix. There are no data on the prevalence or genotypes of HPV in the Panamanian population. We studied 200 Panamanian women of low socioeconomic status, medium and high of 15 to 60 years or more, which went to the clinical screening and monitoring of the Pap test, which voluntarily agreed to participate and signed informed consent. We took a sample to detect HPV cervical scraping through molecular techniques of PCR using the SFP₁₀ primers and LIPA (Line Immuno Probe Assay) to determine the presence of HPV genome and the prevalence for each group age to 25 different HPV genotypes, including 14 carcinogenic types of HPV (VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68). Of the 200 patients, 102 were positive; the prevalence of HPV in the study population was 51% and determined that it was a model with two peaks, one in young women 20 to 24 years (53%) to 25 to 29 years (59%) and then 55 to 59 years in one (83%) and more than 60 years (70%). We found 235 different types; type 52 was the most prevalent (21%) followed by 31 (12%), 6 (10%), 16 (7%), 33 (7%).

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical es la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial esto ha sido plenamente demostrado por estudios epidemiológicos en los que se demuestra que la principal causa de esta etiología, es la infección por el virus del papiloma humano (VPH) de tipo oncogénico (Bosch, *et al* 1995 Sells *et al* 2002 Clifford, *et al* 2005) Mundialmente se reportan tasas de mortalidad de 500 000 por año 80% de las cuales ocurren en países en desarrollo En Centro América, la incidencia es aproximadamente 5 veces la de Europa Occidental (Middleton, *et al* 2007)

Estudios sobre prevalencia de VPH hechos en 22 países del mundo describen la presencia del VPH en un 99% del cáncer invasivo del cuello del útero (Bosch *et al* 1995 Clifford, *et al* 2003 Walboomers *et al* 1999)

El virus del papiloma humano es un virus que infecta el tejido epitelial y mucoso de la piel laringe ano y genitales Su transmisión es por contacto sexual en la mayoría de las veces y puede darse solo con el contacto de la piel sin que la penetración se lleve a cabo (Burchell *et al* 2006)

Cuando la mujer comienza una vida sexualmente activa, es muy probable que adquiriera una infección por un VPH si se trata de un tipo considerado de alto riesgo existe el 80% de probabilidad de que la infección trascienda a una neoplasia intraepitelial cervical (NIC) la cual se clasifica según la gravedad de las lesiones que cause de 0 a 3 Puede que de este estadio no se desarrolle y la infección por VPH desaparezca. En el 20% restante la infección por VPH no desaparece la NIC se desarrolla de 1 a 3 y luego en un cáncer invasivo de cuello de útero si se deja

evolucionar sin el tratamiento adecuado. Si la infección original fue por un VPH de tipo considerado de bajo riesgo, puede que la lesión avance hasta NIC 2 y en muy raras y extremas ocasiones pase a NIC 3 o a carcinoma, en muy raras ocasiones se ha encontrado un tipo considerado de bajo riesgo solo en infecciones donde la lesión sea NIC 3 o un carcinoma (Meijer *et al* 2000)

Datos derivados de estudios relacionados a programas de prevención en Holanda, revelan que el intervalo de tiempo entre la aparición del precursor temprano de lesión NIC 1 y el desarrollo del carcinoma está en 12.7 años. Este mismo estudio señala que como la infección persistente con los tipos de alto riesgo del VPH es necesaria para el desarrollo de NIC, el tiempo estimado de aparición de las malignidades desde el momento de la infección inicial está alrededor de 15 años (Meijer *et al* 2000)

Existen más de cien tipos diferentes de VPH. Estudios de prevalencia mundial indican que la mayor incidencia de cáncer cérvico-uterino está asociada al VPH tipo 16 y que la mayor incidencia de infección por VPH está en mujeres menores de 25 años, pero hay estudios en los que se describe la observación de un nuevo pico de incidencia en mujeres de 45 a 54 años (Bosch *et al* 1995, Sellor *et al* 2003)

Se ha señalado en diferentes artículos científicos, que la mayor incidencia de cáncer cervico-uterino está en mujeres de 35 a 39 años y que se ha documentado un aumento en las muertes por esta causa a nivel mundial. Nuestro país no escapa a esta realidad, en donde año tras año se ha dado un incremento en la cantidad de tumores malignos en el cuello del útero. En Panamá, según datos estadísticos del MINSA del año 2006, el mayor número de muertes por este tipo de cáncer en mujeres se encuentra a partir de los 35 años en adelante (Tumores Malignos de la República de Panamá 1994-2004, MINSA 2006)

De aquí la importancia de determinar el tipo del VPH en el segmento de la población de mayor incidencia (mujeres de menos de 25 años) ya que son ellas las que luego registran el mayor índice de cáncer cervical 15 años después (35 a 39 años) (Walboomers *et al* 1999 Ferenczy *et al* 2003)

Los diferentes tipos de VPH se han clasificado según el tipo de lesión que causan en el epitelio (Muñoz *et al* 2003). Algunos tipos son especialmente agresivos y se han aislado en porcentajes de hasta un 97% en casos de hiperplasia del cuello del útero causando en muchas ocasiones la muerte de quien lo adquirió. La epidemiología basada en evidencia por técnicas moleculares ha permitido dilucidar con precisión esta información. Esta misma metodología ha permitido clasificar el riesgo oncogénico de los diferentes genotipos del VPH relacionando los que se han aislado de verrugas genitales como de bajo riesgo y los aislados de cáncer cervical invasivo como de alto riesgo (Brown, *et al* 1999 Mayrand *et al* 2000)

Estudios previos han determinado la capacidad de los diferentes subtipos de VPH de producir cambios en el epitelio por lo que se tiene una tabla que los clasifica según esta categoría. (Muñoz, *et al* 2003). Otros estudios hablan de la prevalencia de los diferentes genotipos en diversas regiones del mundo o en poblaciones consideradas de alto riesgo los que han permitido relacionar alrededor de 30 tipos de VPH a carcinoma de células escamosas de cuello de útero o adenocarcinomas entre los que se reportan como de mayor prevalencia son los tipos 16 y 18 (Mayrand *et al* 2000)

La clasificación epidemiológica en estos estudios de tipo específicos de VPH establecen los considerados de alto riesgo los siguientes 16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 68 73 y 82. Otros tres tipos se consideran como de posible alto riesgo 26 53 y 66. En los de bajo riesgo se clasifican doce tipos 6 11 40 42 43

44 54 61 70 72 81 \ CP6108 El resto de los tipos identificados se encuentran sin clasificar segun su riesgo (Muñoz *et al* 2003) Estudios filogenéticos establecen relacion de los demas tipos oncogénicos a los tipos de alto riesgo como el VPH 16 (31 33 35 52 \ 58) y al tipo 18 (39 45 59 \ 68) (Chan *et al* 1995)

Se consideran como factores que predisponen a adquirir la infección por VPH el inicio temprano de las relaciones sexuales el cambio frecuente de parejas estados de inmunosupresión \ las infecciones recurrentes de algunos tipos de VPH considerados de alto riesgo de producir cáncer ya que elevan la probabilidad de desarrollar hiperplasia de cuello uterino Estudios epidemiológicos señalan que la infección con VPH es un factor de predisposición a cáncer cervical independiente de cualquier otro factor (Cañadas *et al* 2004)

Aunque muchas mujeres adquieren infecciones de HPV cervicales la mayoría no progresa al cáncer cervical esto puede ser explicado ya que existen otros factores involucrados en el proceso del desarrollo de la enfermedad Entre estos podemos encontrar los siguientes (1) el factor medioambiental o exogeno incluyendo anticonceptivos hormonales tabaquismo numero de gestaciones y la infección conjunta con otros agentes transmitidos sexualmente (2) el factor viral como la infeccion por los tipos especificos de alto riesgo la infección conjunta con otro tipo de VPH, variantes de VPH carga viral y la integración viral (3) los factores del mismo hospedero incluyendo las hormonas endogenas factores genéticos \ otros factores relacionados a la respuesta inmune (Muñoz, *et al* 2006)

Existen diversos metodos de diagnostico para determinar la presencia o no del VPH (Muñoz *et al* 2004 Kitchener *et al* 2006) entre el que esta el del frotis de raspado del cuello del utero por la tincion de Papanicolau en donde se puede observar cambios en las células epiteliales descamadas para este propósito esta técnica tiene la

limitante de no poder asegurar la presencia del VPH en la muestra, de mostrar falsos negativos en casos de infecciones tempranas o en donde aun no son apreciables los cambios citológicos ademas de no poder determinar el tipo de VPH segun su riesgo de producir cancer. En la actualidad las metodologias moleculares cuentan con cebadores especificos para el genoma del VPH por lo que se puede confirmar la presencia de este en la muestra en estudio ademas de poder determinar su genotipo y su riesgo de producir cancer. Estas técnicas pueden ser por Hibridación de Captura o por Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en ingles) seguida de la acción de Enzimas de Restricción que permiten obtener patrones de bandas segun el tipo del VPH hibridacion reversa o secuenciación directa. Con estas técnicas moleculares se puede ofrecer informacion para el tratamiento adecuado del VPH (Sellors *et al* 2003 Hsing Pei *et al* 2004)

Uno de los principales factores de predisposición de cancer cervical es la infección persistente con algun tipo de alto riesgo de VPH, por lo que la secuenciación del genoma viral puede determinar si se trata de la misma cepa o si es una nueva infeccion (Mayrand *et al* 2000)

Aunque los requisitos técnicos de costos e infraestructura pueden hacer dificil la implementación de la prueba de detección del VPH por ADN la literatura sugiere que es mejor que la citología e inspección visual para detectar lesiones precancerosas en mujeres entre 30 y 40 años (Arbyn *et al* 2005 Goldie *et al* 2006). Se están realizando esfuerzos para desarrollar pruebas de ADN dirigidas al genoma del VPH simples y a bajos costos que puedan dar resultados mas rápidos. Para el año 2010 se espera que estudios de la ACCP (*Alliance for Cervical Cancer Prevention*) muestren evidencia en el impacto a largo plazo de la prueba de ADN para VPH en las tasas de incidencia del cáncer cervico uterino www.allianceccc.org

JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas de muerte a nivel mundial son las debidas a los tumores malignos y entre estas las de cuello de utero en mujeres Panamá no escapa a esta realidad en donde las muertes por esta causa se sitúan entre las primeras cinco (Hsing Pei *et al* 2004 Tumores Malignos de la Republica de Panamá 1994 2004 MINSA 2006)

En el año 2002 se detectaron 493 000 nuevos casos de cáncer de cuello de utero (CaCU) y que este causó 274 000 muertes a nivel mundial La mayoría de estos casos fueron reportados en países en vías de desarrollo (83%) (Parkin, *et al* 2006)

El número de muertes por tumores malignos se ha incrementado sostenidamente en nuestro país año tras año hasta el presente Los estudios sobre prevalencia de VPH hechos en Panamá datan de 1984 y 1987 en los mismos se estableció la incidencia de este tipo de CaCU en las diferentes provincias de Panamá dando como resultado de este estudio una incidencia de 284 casos por cada 100 000 habitantes dándose la mayor tasa de incidencia en la Provincia de Herrera con un 79.1 % de los casos nacionales (Reeves *et al* 1984 Arosemena, *et al* 1987 Brenes *et al* 1987) Este estudio también determinó que la mayor incidencia se encontró en mujeres entre 35 y 39 años y además se estableció la incidencia de los genotipos mediante la técnica de Hibridación *in situ* solo para los tipos 6-11 considerados de bajo riesgo y 16 ó 18 de alto riesgo estos estudios fueron realizados gracias a la colaboración del Departamento de Patología de la Universidad de McMaster Hamilton Canadá (Reeves *et al* 1984 Arosemena, *et al* 1987 Brenes *et al* 1987)

Segun el reporte de Salud del Ministerio de Salud de Panamá (MINSA) del año 2003 el numero de casos de cancer de cuello de utero en la Republica de Panamá para el año 2000 fueron de 586 registrándose un incremento de un 206% en 16 años. Segun este mismo reporte la mayor incidencia de este tipo de cáncer esta en la población femenina de entre 30 a 39 años con 157 casos. Para el año 2003 se registraron 157 defunciones por causas de tumores malignos de cuello de utero (Panamá en cifras 2003)

Se encuentra ampliamente demostrado en la literatura (Muñoz, *et al* 1995 Arbyn *et al* 2005 Bosch *et al* 1995) la intima relación que tienen los diferentes genotipos de VPH con la aparición de cáncer de cuello de utero entre los que se han demostrado que algunos tienen un riesgo mucho mayor de producir cáncer que otros. La genotipificación del VPH permite determinar el riesgo de producir cáncer ya que permite determinar el tipo del VPH que está infectando al paciente lo que da luces para decidir el tratamiento a seguir en cada caso particular (Muñoz, *et al* 1995)

Actualmente no se cuentan con estudios actualizados de prevalencia del genotipo más comun en la población panameña, segun la literatura, la mayor incidencia de casos positivos para VPH está en la población femenina de menos de 25 años (Muñoz, *et al* 2003)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar en muestras positivas para el Virus del Papiloma Humano la prevalencia específica de genotipos por grupo de edad y el tipo particular asociado con dichas infecciones en mujeres panameñas sexualmente activas de entre 15 y más de 60 años utilizando técnicas moleculares de PCR con cebadores SFP₁₀ e hibridación reversa, a partir de células cervicales

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1 Aplicar técnicas moleculares a las muestras para determinar la prevalencia del genotipo de Virus del Papiloma humano por grupo etáreo en las mujeres panameñas
- 2 Evaluar la pertinencia de ensayos de aplicación de la vacuna contra el VPH en Panamá utilizando los datos nacionales que permitan a
- 3 Establecer los factores de riesgos para la adquisición del VPH en la población estudiada.

PAPII LOMAVIRIDAE

GENERALIDADES

Papilomavirus es un virus de un cadena doble de ADN fue inicialmente identificado a inicios del siglo 20 cuando se demostró que las verrugas o papilomas cutáneos eran transmisibles a través del contacto íntimo entre parejas. En 1935 Francis Peyton Rous, quien había estudiado anteriormente la presencia de esta entidad en cáncer en gallinas, demostró que este virus era el agente causante de cáncer en conejos infectados, siendo la primera vez que se infería que este era el agente infeccioso causante de cáncer en mamíferos (Historias de la medicina, en línea)

Por sus estudios en el Virus de Papiloma, fue distinguido con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el 1966 (Organización Premio Nobel, en línea)

TAXONOMIA

El Sistema de Clasificación de Baltimore (Baltimore 1971) creada por el ganador del premio Nobel el biólogo americano David Baltimore agrupa y clasifica a los virus en base al método de su síntesis del mRNA y su tipo de genoma, en base a esto los virus son clasificados en siete grupos. Según esta clasificación el *Papillomaviridae* que es un virus pequeño que consiste en una molécula de ADN de doble hebra circular pertenece al Grupo I. Dentro de este grupo se le ubicaba anteriormente dentro de la familia *Papovaviridae* en la cual se incluyen dos géneros *Papillomavirus* y *Polyovirus* ambos se encuentran principalmente infectando a mamíferos.

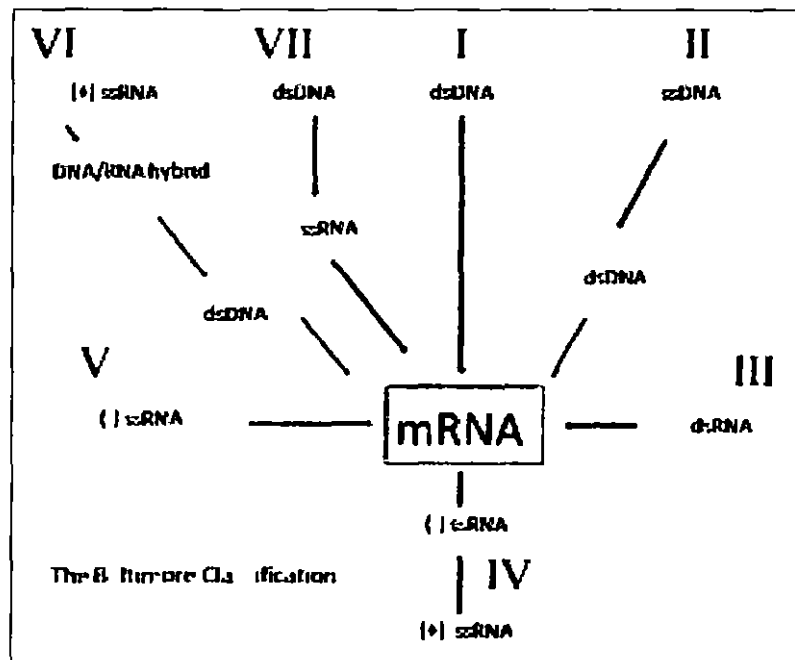
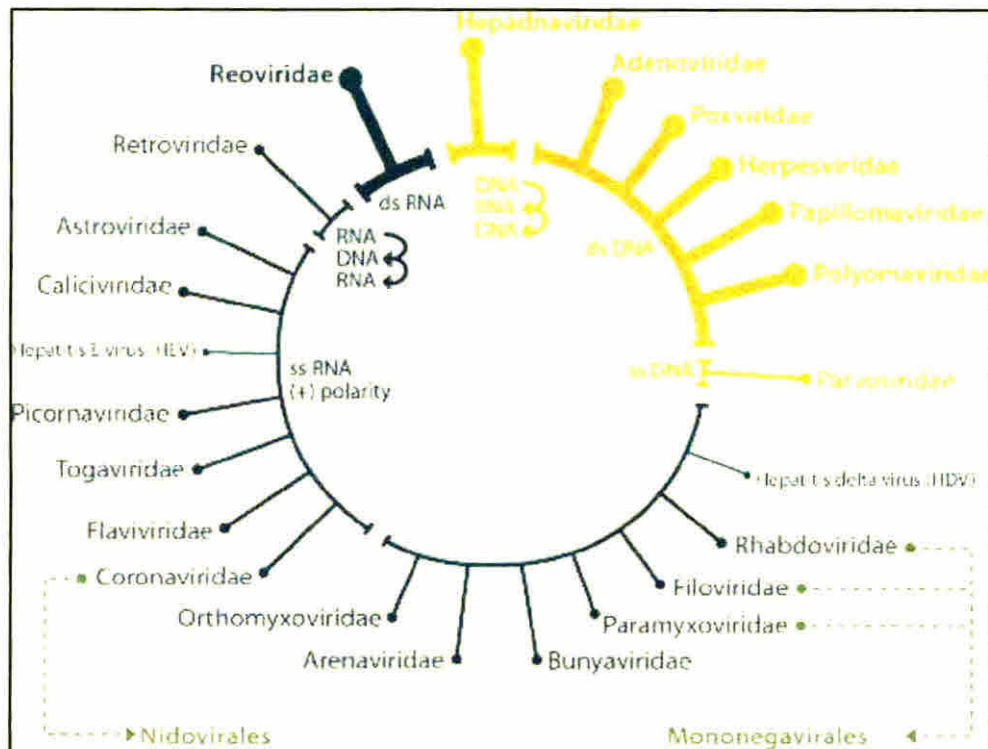


Fig 1 Clasificación de los Virus de Baltimore Baltimore 1971 Expression of animal virus genomes *Bacteriol Rev* 35 (3) 235-41

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus o ICTV, (ICTVdB Management, 2006) por sus siglas en inglés y el Sub-Comité de Virus de Vertebrados, en el año de 1998 reunidos en San Diego California a través del Grupo de Trabajo de *Papoviridae* deciden separar esta familia en dos familias distintas y reconoce al *Papillomaviridae* como filogenéticamente distinto de los *Polyoviridae* por lo que elimina el término *Papoviridae*. (Fig. 2)

A la fecha se han descrito un sinnúmero de tipos y subtipos de Papilomas en base a las diferencias encontradas en la secuenciación de los genes de este virus.



1. Fig. 2 Árbol taxonómico de los virus. (ICTVdB Management, 2006 The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. (visto en línea 17 de noviembre de 2008). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/index.htm>)

MORFOLOGÍA

El Papilomavirus es un virus pequeño de 40-55 nm de diámetro es un virus no envuelto lo que quiere decir que no posee cubierta de lipoproteína sino que está envuelto por una cubierta externa llamada cápside formada por una sola proteína viral conocida como L1. La función de la cápside es la de la protección del material genético del virus y está formada de 72 unidades estructurales o capsómeros en forma de estrella y al igual que todos los virus no envueltos posee simetría geométrica y en particular la simetría del Papilomavirus es icosaédrica (Fig. 3)

La cápside puede ser teñida ya que el tinte la penetra, algunos virus aparentan tener el centro oscuro esto ha permitido ver claramente su forma o arreglo y se han observado formas aberrantes en los cuales el virus adquiere forma tubular o filamentosas, producto de mutaciones del mismo virus. En los Papilomavirus están ausentes los lípidos (ICTVdB Management 2006)

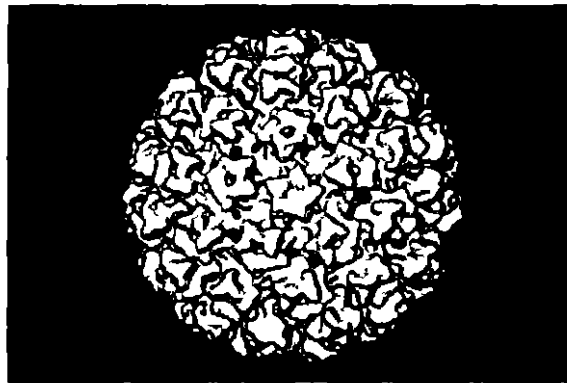


Fig. 3 Cápside del Virus del Papiloma Humano con capsómeros en forma de estrella y simetría icosaédrica

GENOMA

El genoma del Papilomavirus es no segmentado y contiene una sola molécula de doble cadena de ADN la cual se encuentra super enrollada y representa entre 10% al 13% del peso del virus

El genoma completo de este virus oscila entre 5300 y 8000 pares de base (pb) y el contenido de guanidina + citosina es del 40 al 50%. Se encuentra empacado a lo largo de la cápside con las proteínas celulares llamadas histonas las que sirven para envolver el ADN condensado (ICTVdB Management, 2006)

Su genoma está compuesto de 10 regiones codificadoras o de transcripción (marcos abiertos de lectura, ORF por sus siglas en inglés) 8 de las cuales son llamadas tempranas o E del inglés Early (E1 a E8) dos tardías L1 y L2 o L del inglés Late y una no codificadora (NCR o URR) también llamada en inglés long control region o RLC. Estas proteínas están muy conservadas y tienen relación cruzada entre virus específicos para diferentes especies (Muñoz N *et al* 2006). Estas regiones están separadas por dos sitios de poliadenilación los sitios pA Early (A_E) y el pA Late (A_L) (Fig 5 b)

Estas regiones de transcripción codifican para proteínas estructurales y proteínas no estructurales las regiones codificadoras tempranas E están formadas por varias secuencias que codifican para proteínas responsables de la transformación celular replicación y de la persistencia del ADN el cual se encuentra integrado a las células que infecta, estas regiones se expresan inmediatamente después que la célula hospedera es infectada.

La región tardía L está formada por las dos secuencias L1 y L2 que son responsables de la codificación de las proteínas de la cápside en la fase final del

ensamblaje viral. El virión contiene al menos 2 proteínas estructurales o de cápside: la proteína L1 de 559 kDa, llamada mayor o principal ya que esta presente en el 80% del virión y la menor L2 de 76 kDa. Estas proteínas se unen mediante puentes de disulfuro estabilizando la cápside.

La región o unidad reguladora no codificadora también llamada región larga central RLC ó URR, es de 0,4 a 1 Kb y es esencial para funciones reguladoras del genoma, origen de la replicación del ADN y potenciadora de la replicación viral. (Fig. 4).

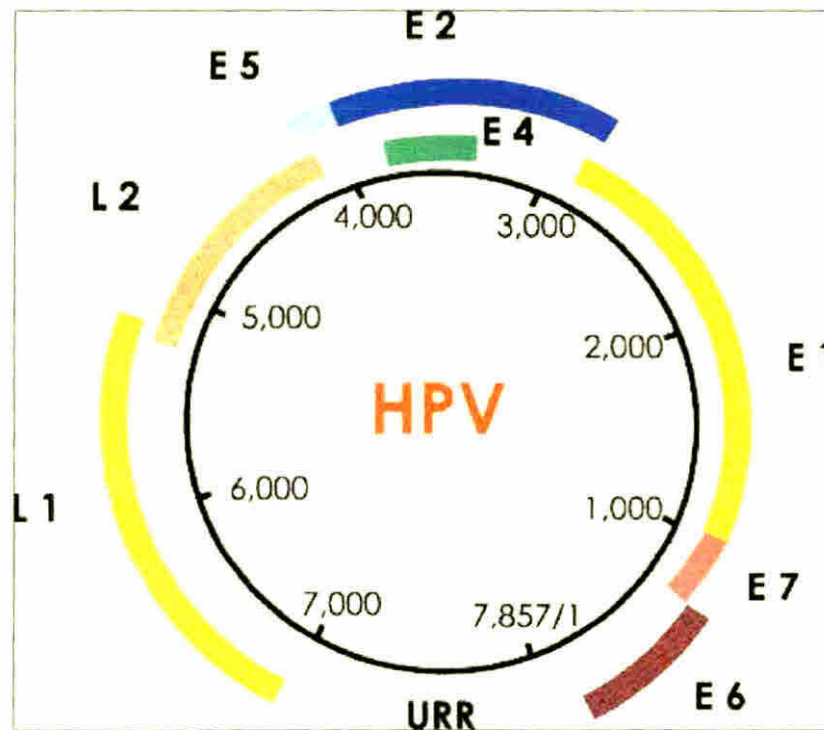


Fig. 4 Representación del genoma del virus del Papiloma Humano.

La región RLC ó URR tiene dos dominios funcionales principales, uno de ellos es el RE2, el cual está regulado por la proteína viral E2 y es donde se encuentra el origen de replicación del ADN viral y el promotor temprano; el otro es el CE

(celular enhancer) que es un fuerte potenciador de la transcripción, la cual depende de factores transcripcionales celulares exclusivamente (Alvarez y López 1995)

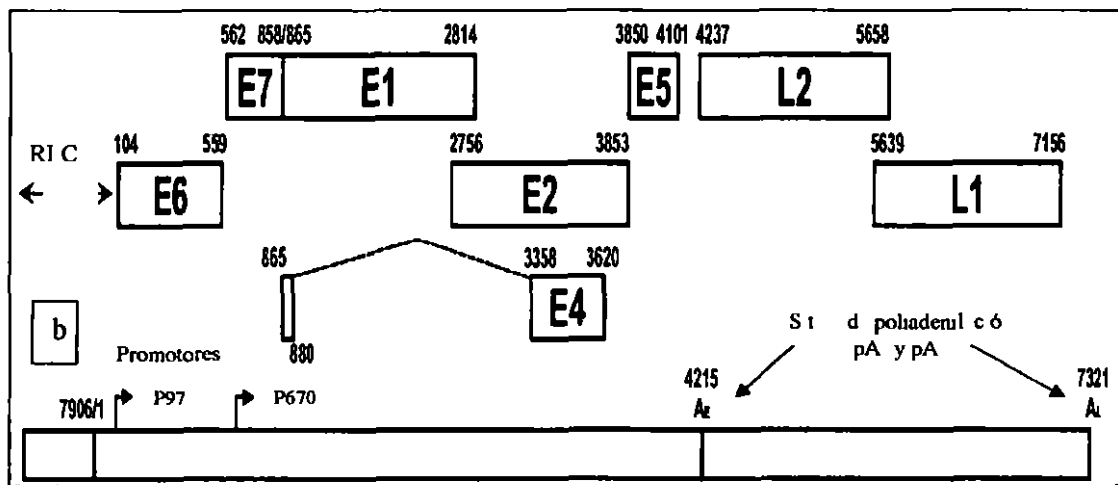
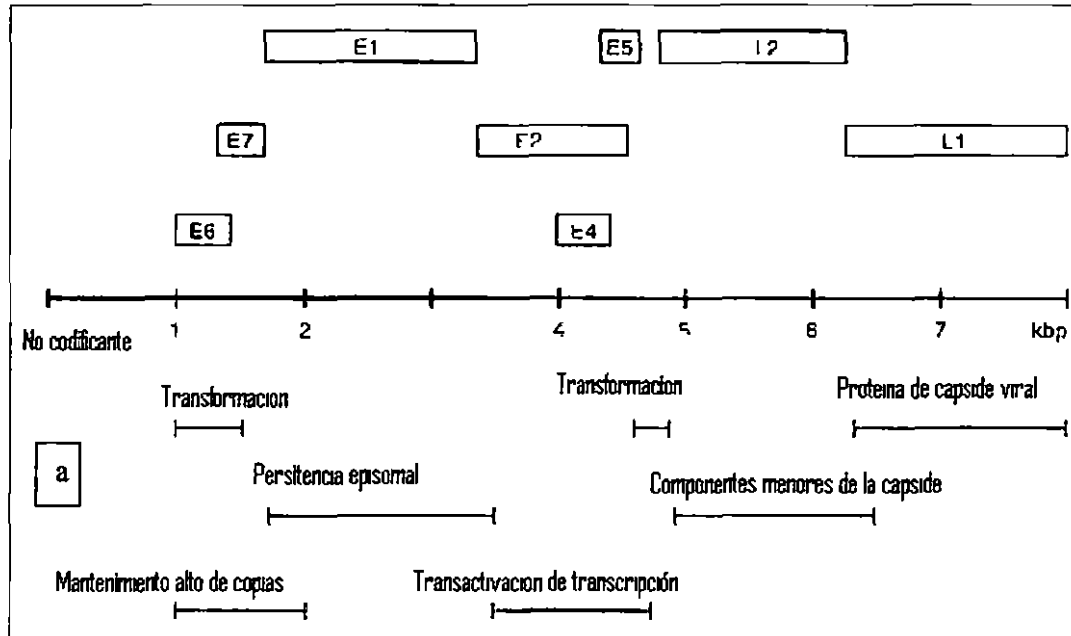


Fig 5 (a) Funcion de los genes del VPH Samuel Baron Medical Microbiology 4ta Edicion Seccion 2 Capitulo 47 (b) Estructura genomica y mapa transcripcional del VPH tipo 16 Zheng y Baker 2006

HOSPEDEROS

El Papilomavirus infecta aves y mayormente a mamíferos incluyendo a los humanos. El Virus de Papiloma Bovino tipo 1 ó BPV1 junto al Papiloma Humano tipo 1 o VPH 1 fueron los primeros en ser secuenciados y por más de dos décadas el BPV1 ha servido de modelo para estudiar la biología molecular de los Papilomas (Zheng y Baker 2006)

a. Papilomavirus en Aves, el genoma del Papiloma Aviar fue clonado y secuenciado totalmente a partir de una lesión cutánea en *Psittacus eritacus* (Perico gris africano) por lo que fue nombrado PePV. A diferencia de los demás Papilomas el PePV carece de la región temprana E6/E7 (Tachezy R, *et al* 2002)

Se le ha relacionado a crecimientos similares a verrugas y también a desarrollo de cáncer

b. Papilomavirus en Mamíferos se ha encontrado en perros, conejos, bovinos y equinos. El Virus de Papiloma Bovino (VPB) se encuentra mayormente infectando al ganado en donde causa verrugas conocidas como papilomas o fibropapilomas en piel y en el tracto alimentario. En algunos casos raros se le ha encontrado como causante de algunos tipos de cáncer en la vejiga urinaria y el tracto alimentario. En caballos y burros es el agente causante de tumores de piel tipo sarcoide.

Existen 6 tipos de VPB los cuales se clasifican en tres grupos según su estructura genómica, la forma en que infectan a sus huéspedes y los efectos que causan en estos (Campos 1995)



Fig. 6 Perro con verruga bucal por virus de papiloma.



Fig. 7 Conejo infectado con virus de papiloma.

c Papiloma en humanos. El virus del papiloma humano (VPH) se considera como el virus más comunmente trasmitido via sexual infecta el tejido epitelial de la piel mucosas laringe ano y genitales donde causan lesiones como verrugas condilomas tumores y lesiones cancerosas en diferentes órganos

Se han descrito más de 120 tipos diferentes de VPH, los cuales han sido clasificados segun el potencial de estos de causar malignidades en el tejido que infectan así que se clasifican en grupos de alto y bajo nesgo de producir cáncer Los de bajo nesgo generalmente están asociados a la producción de verrugas en piel laringe o región anogenital Los de alto nesgo han sido asociados a producción de cáncer cérvicouterino en la mujer o de pene en el hombre

El VPH causa una serie de lesiones en los humanos entre las que se encuentran

1c Verrugas comunes las cuales parecen en la piel de las manos y pies pero también en otras partes del cuerpo como codos y rodillas Estas verrugas tienen la apariencia de una coliflor la cual está ligeramente más elevada sobre la piel que la rodea y están asociadas a los VPH de tipo 2 y 7 Estos tipos no se han relacionado a verrugas genitales ni a desarrollo de malignidades (Fig. 8 y 9)

2c Verrugas plantares, crecen en la base del pie y lo hacen generalmente hacia dentro de la piel causando dolor al caminar los tipos relacionados a este tipo de verruga son el 1 2 y 4



Fig. 8 Paciente con verruga común tipo cuerno.



Fig. 9 Paciente con verrugas en forma de coliflor.

También, algunos tipos de VPH pueden causar verrugas subunguales (crecen debajo de las uñas) o periunguales (alrededor de las uñas); las verrugas planas se encuentran en brazos cara o nuca, generalmente en niños o adolescentes.

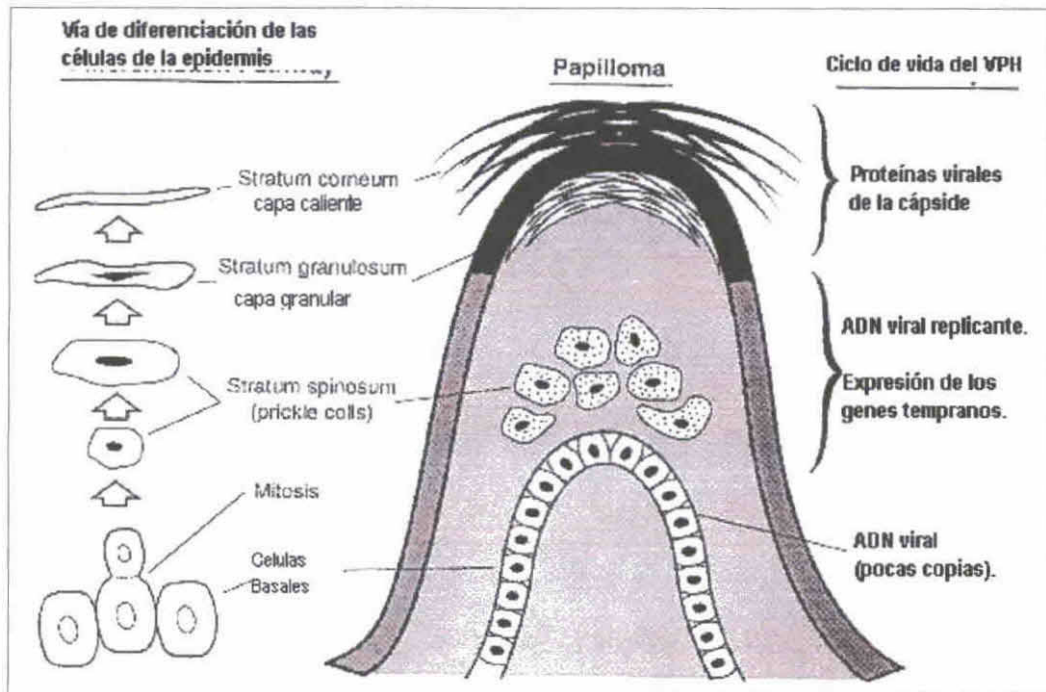


Fig. 10 Representación esquemática de una verruga de la piel causada por el Virus del Papiloma. Samuel Baron. Medical Microbiology. 4ta Edición. Sección 2, capítulo 66.

3c. Verrugas Genitales: son causadas por VPH que son afines específicamente a las mucosas, piel e inclusive en la laringe de los humanos, son causadas principalmente por los tipos VPH 6 y 11. Generalmente son benignas, pero pueden causar deformidades en el área ano genital. (Fig. 11).

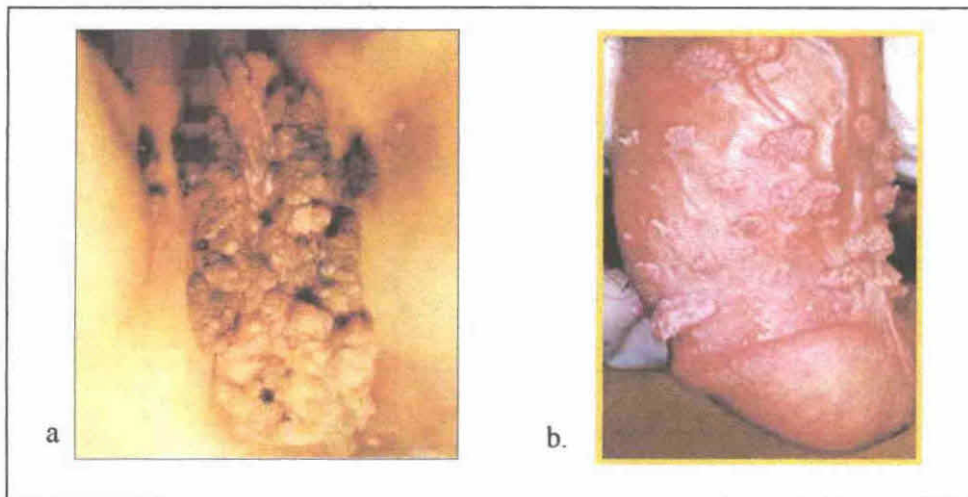


Fig. 11 Verrugas genitales en a. vulva y b. pene.

4c. Epidermodisplasia verruciformis: Entre las manifestaciones más agresivas de este virus en las mucosas de los humanos, está la condición genética congénita autosómica recesiva llamada Epidermodisplasia verruciformis o Displasia de Lewandowsky-Lutz, cuya aparición es rara y conlleva a una hipersensibilidad a ciertos tipos de VPH, tales como el VPH tipo 5 y 8 aunque se cree que otros tipos también pueden contribuir.

Las personas con esta condición, al momento en que son expuesta a estos tipos de VPH, comienzan a desarrollar una amplia cantidad de maculas o pápulas generalmente en los pies y en las manos. Generalmente se genera en la niñez pero se puede presentar a mediana edad y no se conoce cura para la misma. (Fig. 12)



Fig. 12 (a.) y (b.) Pacientes con Epidermodisplasia Verruciformes.

5c Papilomatosis Laríngea Recurrente (PRL) o respiratoria es una enfermedad rara, descrita por primera vez hace unos 300 años la cual causa el crecimiento de verrugas en el tracto aéreo-digestivo con predilección por la laringe. Entre las consecuencias de esta enfermedad están la obstrucción de las vías aéreas superiores causando tos persistente, neumonía recurrente, dolor al tragar, retraso en el desarrollo y cuadros agudos respiratorios graves.

<http://www.equidad.org.mx/deser/seminario/internas/lecturas/lecturas/vph.pdf>

La PLR es causada generalmente por los tipos 6 y 11; en menor frecuencia se ha relacionado al tipo 18. Se presenta en niños menores de 5 años o en la tercera década de la vida de la persona.

En los niños se adquiere al momento de nacer por parto vaginal cuando la madre está infectada con los tipos arriba mencionados en verrugas genitales; en el adulto la transmisión es vía sexual. Este tipo de afección es más severa en pacientes con inmunodeficiencias primarias o secundarias. Papilomatosis Laríngea Recurrente Juvenil

6c Cáncer. En la segunda mitad de la década de los años 70 mediante estudios científicos fue sugiriendo el papel oncogénico del VPH, cuando se detectó el primer tipo genital. En los años 80 se pudo detectar el genoma viral en neoplasias cérvico-uterino y desde entonces se conoce el poder de las proteínas virales del VPH para immortalizar y transformar los keratocitos humanos. El VPH se ha encontrado en cáncer cervical, ano, vulva, pene, cáncer de amígdalas y ciertos tipos de cánceres de cabeza y del cuello (Shetty *et al* 2005) (Fig 13).

El VPH tiene afinidad por los tejidos epiteliales del tracto ano-genital del humano. Su transmisión es por contacto sexual y como lo describe estudios recientes puede darse solo con el contacto de la piel sin que la penetración se lleve a cabo.

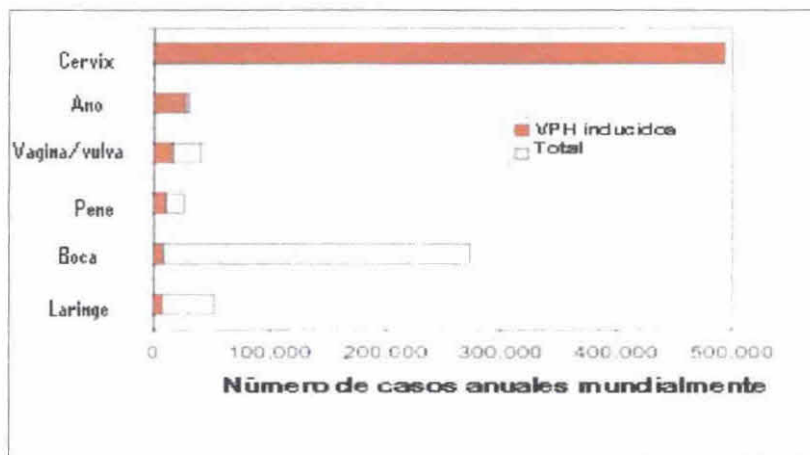


Fig. 13 Número de casos de diferentes tipos de cáncer relacionados al VPH.

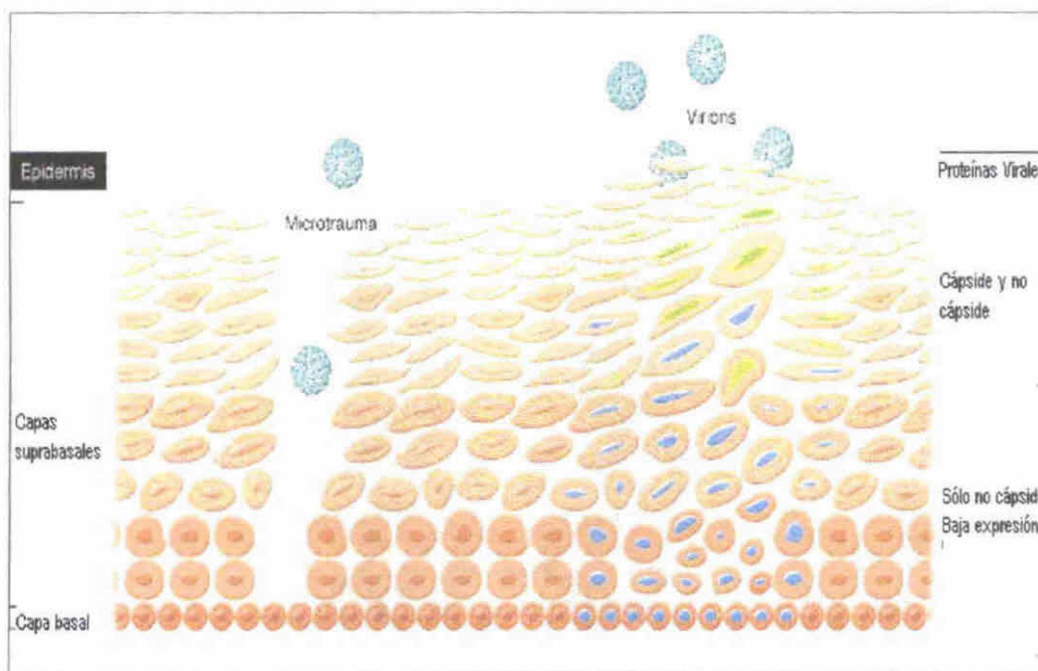


Fig. 14 Ciclo de vida del Virus del papiloma humano, tomado del Prophylactic human papillomavirus vaccines *Journal of Clinical Investigation*. Douglas R. Lowy, et al., 116:1167 2006. doi:10.1172/JC128607.

MECANISMO DE INFECCIÓN

Los VPH son muy específicos en cuanto a las especies y tejidos que infectan, para establecer la infección, el virus debe infectar a las células epiteliales basales que son de larga vida, con propiedades similares a las de las células madre. La infección se da probablemente a través de las rupturas de la piel de la superficie mucosa o microtraumas en las células de las capas suprabasales epidérmicas que permiten al virus infectar a la célula en la capa basal en donde el virus permanece latente en la célula como un episoma redondo (elemento genético que puede integrarse en muchos casos mediante un proceso de recombinación, en un cromosoma del organismo que lo porta) donde los genes virales están muy poco expresados. La replicación viral se lleva a cabo en las capas suprabasales y está vinculada al proceso de diferenciación epidérmica. (Shetty *et al* 2005)

Cuando las células epidérmicas se diferencian y migran a la superficie el virus se activa para replicarse y madurar. La presencia del virus causa anomalías morfológicas en el epitelio alterando el carácter de la epidermis dando como resultado en excrecencias cutáneas o de las mucosas conocidas como verrugas incluidas las papilomatosis, Parakeratosis y koilocitosis.

El VPH se multiplica dentro de la célula infectada produciendo cambios morfológicos en el tejido epitelial estratificado basal de tipo de acantosis (lesión cutánea que se caracteriza por el engrosamiento del cuerpo mucoso de Malpighi) o hiperqueratosis (trastorno caracterizado por el engrosamiento de la capa externa de la piel) confiriéndole la capacidad de producir tumores. (Suárez, M *et al* 2006). El virus de Papiloma se replica y ensambla exclusivamente en el núcleo infecta el keratocito de la capa basal del epitelio escamoso estratificado. La replicación y

diferenciación de los genes virales está íntimamente relacionada con la diferenciación del keratocito ya que el virus utiliza su mecanismo de replicación celular aunque este mecanismo aun no se conoce en su totalidad se tiene como consenso que la expresión de los genes virales es liderada por la expresión de las 6 proteínas no estructurales (E1 E2 E4 E5 E6 y E7) de la región temprana del genoma viral en keratocitos no diferenciados o medianamente diferenciados y la expresión de las proteínas estructurales de la cápside (L1 y L2) de la región tardía del genoma viral en keratocitos en vías de finalizar su diferenciación (Zheng y Baker 2006)

Uno de los tipos de VPH más estudiados es el tipo 16 por su alta relación con el cáncer cérvico uterino se ha propuesto un modelo en el cual las proteínas E6 y E7 son expresadas por un promotor temprano o Early llamado p97 en las capas basales bajas La expresión de otras proteínas tales como la E4 y presumiblemente la E2 E1 y E5 cuyos genes se encuentran secuencia abajo del promotor p670 de este mismo tipo de VPH, se activa después que la expresión de E6 y E7 cesa. Las células que han expresado la E4 y la E7 contienen todos los productos de transcripción temprana que facilitan la amplificación del genoma viral La expresión de las proteínas de la cápside viral (L1 y L2) se da después de que se ha completado la amplificación viral y ocurre en aquellas células que expresaron la E4 (Fig 15)

Por razones desconocidas la infección de VPH tiende a causar cáncer en las áreas llamadas zonas de transformación que es donde un tipo de epitelio toca y gradualmente reemplaza a otro transformándose literalmente a través de un proceso llamado metaplasia. El cérvix, ano y amígdalas son ejemplos de tejidos con zonas de la transformación predispuestas a carcinogénesis por VPH En el caso del cérvix, es el área del epitelio columnar que se transforma en el epitelio escamoso (Shetty *et al* 2005)

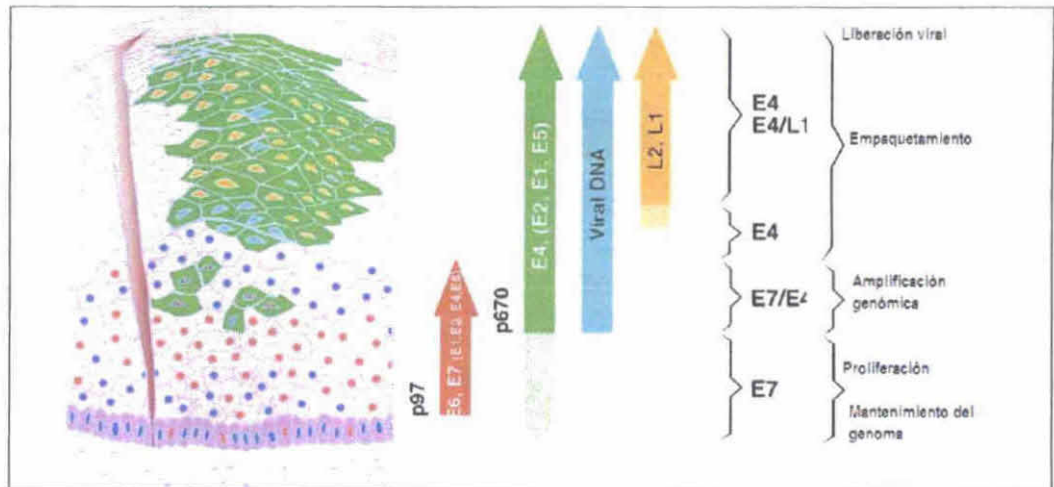


Fig. 15 Expresión de los genes virales en una infección por VPH. Tomado de Zheng y Backer, 2006.

El proceso en los niños es relativamente inactivo, y se torna bastante activo alrededor de la pubertad. La zona de infección de VPH cervical se extiende hasta la vagina, pero es el área de epitelio cervical que sufre metaplasia escamosa el que es más propenso a la carcinogénesis.

Para que la zona de la transformación se infecte con VPH, es probable que el contacto sexual implique la mayoría de las rutas de exposición. (Moscicki, *et al.*; 2006).

PREVALENCIA DEL VPH EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICO UTERINO

El cancer cervical es la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial lo cual ha sido plenamente establecido por estudios epidemiológicos en todas partes del mundo y la principal causa de esta etiologia es la infeccion por el virus del papiloma humano (VPH) de tipo oncogénico (Bosch *et al* 1995 Clifford, G M *et al* 2003 Walboomers *et al* 1999 Mayrand *et al* 2000 Brown *et al* 1999) La prevalencia viral es el producto de la incidencia (aparición de nuevos casos) y la duracion de los mismos (persistencia)

Estudios sobre prevalencia en 22 paises describen que en un 99% de los casos de cancer invasivo del cuello del utero se encuentra presente el VPH (Bosch *et al* 1995 Clifford G M *et al* 2003 Walboomers *et al* 1999 Mayrand *et al* 2000 Brown, *et al* 1999)

Cada año se reportan 500 000 nuevos casos de cancer cérvico uterino a nivel mundial de estos el 80% proceden de paises en vias de desarrollo en donde los sistemas de salud son ineficientes y/o ineficaces Cada año mueren 230 000 mujeres por causa de este tipo de cáncer (Perez, *et al* 2007)

En la mayoría de los paises la incidencia se eleva en mujeres de 35-40 años pero su maximo pico está en mujeres de 50 70 años a diferencia de los paises en vias de desarrollo donde del 80 al 90 % de los casos se da en mujeres de más de 35 años (Deluca, *et al* 2004) La incidencia más alta se observa en Sahara (Africa Sur) Melanesia, America Latina y el Caribe Asia Sur y Central y Asia Sur Oriental (Parkin *et al* 2006)

A nivel mundial se ha reportado un incremento año tras año en las muertes por cáncer de cuello de útero y pene asociados a VPH, de aquí la importancia de determinar el tipo del VPH en el segmento de la población de mayor incidencia (mujeres de menos de 25 años) ya que son ellas las que luego registran el mayor índice de cáncer cervical 15 años después (35 a 39 años) (Ferenczy *et al* 2003 Walboomers *et al* 1999). La prevalencia de la infección con el VPH ha sido motivo de estudios científicos en diferentes partes del mundo por su importancia epidemiológica en el desarrollo del cáncer cervicouterino. En diferentes estudios multicéntricos se han comparado la prevalencia del VPH en distintos países llegando a la conclusión de que en los países en vías de desarrollo se encuentran los porcentajes de prevalencia más altos, esto debido muy probablemente a la pobreza y la falta de educación los cuales son factores de riesgo que inciden como detonantes de la adquisición de infecciones por VPH. En países desarrollados tales como Estados Unidos de Norteamérica y países Europeos se ha encontrado una tasa de prevalencia mucho más bajas (Dunne *et al* 2007 Clifford, *et al* 2005).

En un estudio tipo meta análisis sobre la prevalencia del VPH en 10 058 casos incluidos en 85 estudios de Europa, Asia y África, se encontró que la prevalencia de la infección está en promedio en un 73% de los casos tipo histológicos. Que en aquellos estudios que combinaron análisis citológicos con pruebas por PCR, tuvieron una prevalencia ajustada significativamente mayor (92.5%) que en aquellos donde se utilizó solamente técnicas citológicas por células exfoliadas (78.9%) o por biopsias fijadas (83.3%) (Clifford *et al* 2003 Kitchener *et al* 2006).

EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCIÓN POR VPH

Cuando la mujer comienza con una vida sexualmente activa, es muy probable que adquiera una infección por un VPH. Si se trata de un tipo que es considerado de alto riesgo, existe la probabilidad del 80% de que la infección trascienda a una neoplasia intraepitelial cervical (CIN por sus siglas en inglés) la cual se clasifica según la gravedad de las lesiones que cause de 0 a 3 y que de este estadio no se desarrolle, dado esto es probable que la infección por VPH desaparezca. En el 20% restante, el VPH no desaparece y la lesión CIN se desarrolla de 1 a 3 y luego en un cáncer invasivo de cuello de útero (Meijer *et al* 2000).

Si la infección original fue por un VPH de tipo considerado de bajo riesgo, puede que la lesión avance hasta CIN 2 y en muy raras u ocasiones extremas, pase a CIN 3 o a carcinoma. Raras veces se ha encontrado un tipo considerado de bajo riesgo causando por el solo infecciones donde la lesión sea CIN 3 o carcinoma. (Meijer *et al* 2000).

Datos derivados de estudios relacionados a programas de prevención en Holanda, revelan que el intervalo de tiempo entre la aparición del precursor temprano de lesión CIN 1 y el desarrollo del carcinoma está en 12.7 años. Este mismo estudio señala que la infección persistente con los tipos de alto riesgo del VPH es necesaria para el desarrollo de CIN, el tiempo estimado de aparición de las malignidades desde el momento de la infección inicial está alrededor de 15 años (Meijer *et al* 2000).

Estudios de prevalencia mundial indican que la mayor incidencia de cáncer cérvico uterino está asociada al tipo 16 para las diferentes regiones del planeta y que la mayor incidencia de infección por este tipo de VPH, está en mujeres menores de 25

años pero hay estudios en los que se describe la observación de un nuevo pico de incidencia en mujeres de 45 a 54 años (Bosch *et al* 1995 Sellor *et al* 2003)

Se ha informado de dos modelos de curvas de prevalencia asociada a la edad específica en presencia de VPH. En algunas poblaciones el pico se encuentra en mujeres de alrededor de 20 años con un marcado declive que produce niveles muy bajos en mujeres de más edad. En otras poblaciones, sobre todo aquellas de países con poblaciones con mayor riesgo de cáncer cervical, se ha observado una distribución bimodal con un primer pico alrededor de los 20 años y un segundo pico alrededor de la edad 45 a 50 años. Sin embargo, la forma de la curva de incidencia de edad específica por presencia de VPH es desconocida, existe muy limitada información de la incidencia y determinantes de la infección de VPH en las mujeres de mediana edad (Muñoz *et al* 2004). Este tipo de comportamiento bimodal puede deberse a que en el primer pico el grupo etareo es sexualmente muy activo, después de unos años las parejas se estabilizan y finalmente puede ocurrir que la pareja se deshaga y tengan nuevas parejas o uno de los dos vuelva a ser sexualmente muy activo con otras parejas (Muñoz *et al* 2004).

En Costa Rica, un estudio demostró que las infecciones de VPH tenían 2 picos: el primero en mujeres jóvenes y el segundo estaba en las mujeres de 55 años o mayores y que era predominantemente a la infección con tipos de bajo riesgo o tipos no caracterizados, aunque un aumento ligero en los tipos de alto riesgo también fue observado (Herrero *et al* 2000 Castle *et al* 2005).

Estudios epidemiológicos señalan que no importa que tipo de alto riesgo sea el que está infectando a la paciente, ya que para fines clínicos relacionados a cáncer cervical cualquier tipo detectado por las pruebas es suficiente para alertar y tomar

medidas preventivas en cuanto a tratamiento y seguimiento de la paciente (Muñoz *et al* 2003 Franco *et al* 2001)

La histopatología es importante en el manejo clínico pero para la investigación preventiva y epidemiológica, tiene sentido creciente considerar las infecciones de VPH como un solo estado amplio en la transición entre el estado normal y pre-cáncer. Las características virales más importantes son el genotipo y tiempo de persistencia. (Moscicki *et al* 2006) Es importante comprender que la historia natural de infecciones por VPH se presenta con lesiones dudosas que no son notablemente diferentes de las que presentan el cambio koilocitótico clásico o CIN I. De hecho, el tipo de VPH que está infectando es más importante que la presencia o ausencia de evidencia microscópica leve de infección en la predicción de riesgo de cáncer porque los tipos no carcinogénicos también causan anomalías histológicas por lo que considerando esto, el tipo de VPH es el que predice el resultado.

Puede definirse ampliamente la persistencia, como el descubrimiento del mismo tipo de VPH dos o más veces con un intervalo de tiempo dado entre los exámenes. Algunos datos sugieren que el tipo de VPH 16 persiste mucho más tiempo en promedio que cualquier otro tipo. La persistencia a largo plazo (5–7 años) no está estrictamente en correlación con la carcinogenicidad, desde que algunos tipos no carcinogénicos muestran persistencia larga también, por ejemplo el VPH tipo 61 pero la persistencia de los tipos carcinogénicos se relaciona fuertemente a estadios pre-cancerosos (Moscicki *et al* 2006). En un estudio de seguimiento a largo plazo se indica que este riesgo es particularmente alto para las mujeres con VPH 16 o 18 comparados a las mujeres con cualquiera de los otros tipos considerados de alto riesgo (Wright, *et al* 2006).

CLASIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE VPH

La epidemiología basada en evidencia por técnicas moleculares ha permitido dilucidar con precisión la clasificación de los genotipos de VPH esta misma metodología ha permitido clasificar el riesgo oncogénico de los diferentes genotipos relacionando los que se han aislado de verrugas genitales como de bajo riesgo y los aislados de cáncer invasivo cervical como de alto riesgo (Mavrand *et al* 2000 Brown, *et al* 1999) El genoma de los tipos de VPH que han sido identificados ha sido secuenciado lo que ha permitido determinar que difieren los unos de los otros en tan solo $\geq 10\%$ de la secuencia de su genoma. (Da Costa, *et al* 2002)

Se han descrito más de 120 genotipos de VPH la genotipificación se basa en el grado de homología del ADN una vez secuenciado el genoma viral de las regiones L1 la cual se encuentra muy bien conservada, también se han secuenciado las regiones E6 y E7 Una similitud de las secuencias de estas regiones inferior al 90% supone un tipo nuevo y del 90% o por arriba un subtipo de tipo anteriormente descrito (<http://www.internationalpublichealthreportingassociation.org/>)

De los diferentes tipos de VPH que se han identificado unos 40 tipos pueden infectar el tracto urogenital del humano estos dieron lugar a la clasificación según el riesgo de producir cáncer (Clifford, *et al* 2003)

Existe otra clasificación filogenética, según el orden o secuencia de los nucleótidos de su genoma, esta última clasificación permite ubicar los tipos nuevos de VPH que se van identificando aun cuando no se haya podido establecer su clasificación epidemiológica. Al comparar estas dos clasificaciones vemos que no coinciden en algunos casos en cuanto a su capacidad de producir cáncer Existen subgrupos considerados de alto riesgo ya que pueden producir hiperplasia del tejido

epitelial de los genitales pero filogenéticamente proviene de VPH de bajo riesgo y viceversa. (Chan, *et al* 1995)

		Epidemiología	
		Alto riesgo	Bajo riesgo
Filogenética	Alto riesgo	16 18 26 31 35 39 45 51 52 53 58 59 66 68 82	70
	Bajo riesgo	73	6 11 40 42 43 44 54 61 72 81 CP6108

Fig 16 Clasificación Epidemiológica y Filogenética de los diferentes tipos de VPH

En la Fig 16 se puede observar que filogenéticamente el genotipo 73 corresponde a un tipo de bajo riesgo de producir cáncer pero epidemiológicamente se ha asociado a los de alto riesgo ya que se ha encontrado en tejidos cancerosos (Chan *et al* 1995)

Los diferentes subtipos de este virus se han clasificado epidemiológicamente según el tipo de lesión que causan en el epitelio. Algunos tipos son especialmente agresivos y se han aislado en porcentajes de hasta un 99% en casos de hiperplasia del cuello del útero causando en muchas ocasiones la muerte de quien lo adquirió.

Estudios previos han determinado la capacidad de los diferentes subtipos de VPH de producir cambios en el epitelio. Otros estudios hablan de la prevalencia de los diferentes genotipos en diversas regiones del mundo o en poblaciones consideradas de alto riesgo los que han relacionado alrededor de 30 tipos de VPH asociados a carcinoma de células escamosas de cuello de útero o adenocarcinomas entre los que se reportan como de mayor prevalencia son los tipos 16 y 18 (Mayrand *et al* 2000)

La clasificación epidemiológica en estudios científicos acerca del tipo específicos de VPH establecen que los considerados de alto riesgo son los siguientes genotipos 16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 68 73 y 82. Estos otros tres tipos se consideran como de posible alto riesgo 26 53 y 66. En los de bajo riesgo se clasifican doce genotipos 6 11 40 42 43 44 54 61 70 72 81 y CP6108. El resto de los genotipos de VPH identificados se encuentran sin clasificar según su riesgo (Muñoz *et al* 2003).

Estudios filogenéticos establecen que los tipos de alto riesgo 31 33 35 52 y 58 están relacionados al VPH tipo 16 y al VPH tipo 18 del que se derivan los tipos 39 45 59 y 68 (Chan *et al* 1995).

Los condilomas acuminados o verrugas genitales son producidas por VPH tipo 6 ó el tipo 11. Estudios especialmente dirigidos a estos tipos y sus consecuencias concluyen que estos tienen histología y manifestaciones clínicas idénticas. Estudios recientes han mostrado que el 100% de las verrugas genitales son causadas por VPH tipos 6 ó 11 pero que el 20 al 50% de estas lesiones también contienen co infección con tipos de VPH de alto riesgo. Las verrugas genitales normalmente no producen mayor morbilidad o mortalidad pero causan una significativa morbilidad psicológica y los costos de salud son sustanciales (Lacey *et al* 2006) (Fig 17).

VPH Tipos y su asociación con las principales enfermedades		
Enfermedad	VPH frecuentes	VPH menos frecuentes
VERRUGAS		
Verruga plantar	1 2	4 6 3
Verruga comun	1 2 7 10	3 4 26 27 28 29 41 57 65
Verruga plana	3 10	27, 38, 41, 49
CONDILOMAS		
NEOPLASIA INTRAPITELIAL DEL	6 11	30 42 44 45 51 54 55 70
TRACTO GENITAL INFERIOR Y ANO	30 34 39 40 53 57 59 62 64 66	
Bajo grado	67 69	
Alto grado	6, 11	16, 18, 31, 35, 42, 44, 45, 51, 52
	16, 18	6, 11, 31, 33 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52 56, 58, 66
PAPULOSIS BOWENOIDE	18	31, 34, 39, 42, 45
CÁNCER DE CERVIX	16, 18	31 33 35 39 45 51 52 56 58 66
CÁNCER DE PENE, VULVA, VAGINA Y ANO	18 18	31 33 35 39 45 51 52 56 58 66
OTROS CÁNCERES		
Cánceres de piel escamosos y basocelular	2 3 5 8 9 10	12 14 15 17 19 20 21 25 36 37
		38, 47, 50
Cáncer de amígdala y orofaringe	16	31, 33
Cáncer perungual y conjuntiva	16	
Otras enfermedades		
Enfermedad verruciforme	2 3 5 8 9 10	12 14 15 17 19 20 21 25 36 37
		38 47 50
Papilomatosis respiratoria recurrente	6 11	32
Papiloma conjuntivales	6, 11, 18	

Fig 17 Tipos de VPH relacionados a diferentes tipos de afecciones en los humanos

MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN A LESIONES MALIGNAS

El mecanismo exacto de transformación maligna inducida por VPH no ha sido determinado con exactitud hasta la fecha. (Da Costa, *et al* 2002) Sin embargo la evidencia apunta a un papel crítico para los genes E6 y E7 del genoma del VPH. Se ha reportado que las regiones E6/E7 están siempre virtualmente expresadas en los cánceres causados por VPH (Zheng *et al* 2006) estas se unen a proteínas supresoras de tumor las cuales eliminan su función favoreciendo la transformación y la malignización de la célula (Mascareña De Los Santos *et al* 2007) lo cual puede explicar la función del VPH en el proceso de oncogénesis.

Se ha mostrado que la transformación de keratocitos requiere de la expresión proteica de E6 o E7. Las lesiones intraepiteliales escamosas muestran niveles superiores de expresión de E6 y E7 que las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado y la expresión continua de ambas proteínas se exige para mantener el estado maligno. Hay evidencia que las proteínas E6 y E7 de los tipos 16 y 18 cooperan para inducir la transformación maligna a través de su habilidad de unirse al ciclo celular que regula las proteínas de p53 y la proteína del retinoblastoma (pRb 105). Ambas son proteínas que inhiben la progresión del ciclo celular la inactivación de estas por las proteínas virales E6 y E7 lleva a la célula a entrar a la fase S de su ciclo celular de manera no regulada. La E6 inactiva la función de p53 del tipo silvestre reforzando su degradación y produciendo niveles intracelulares insuficientes de esta proteína supresora de tumor. En la minoría de líneas celulares de cáncer cervical que no están infectadas con VPH, el p53 se vuelve inactivo por mutación. Así la inactivación de p53 a través de la unión o mutación de E6 parece ser un

componente central del proceso de transformacion maligna en cáncer cervical
(Cannistra, *et al* 1996) (Fig 18)

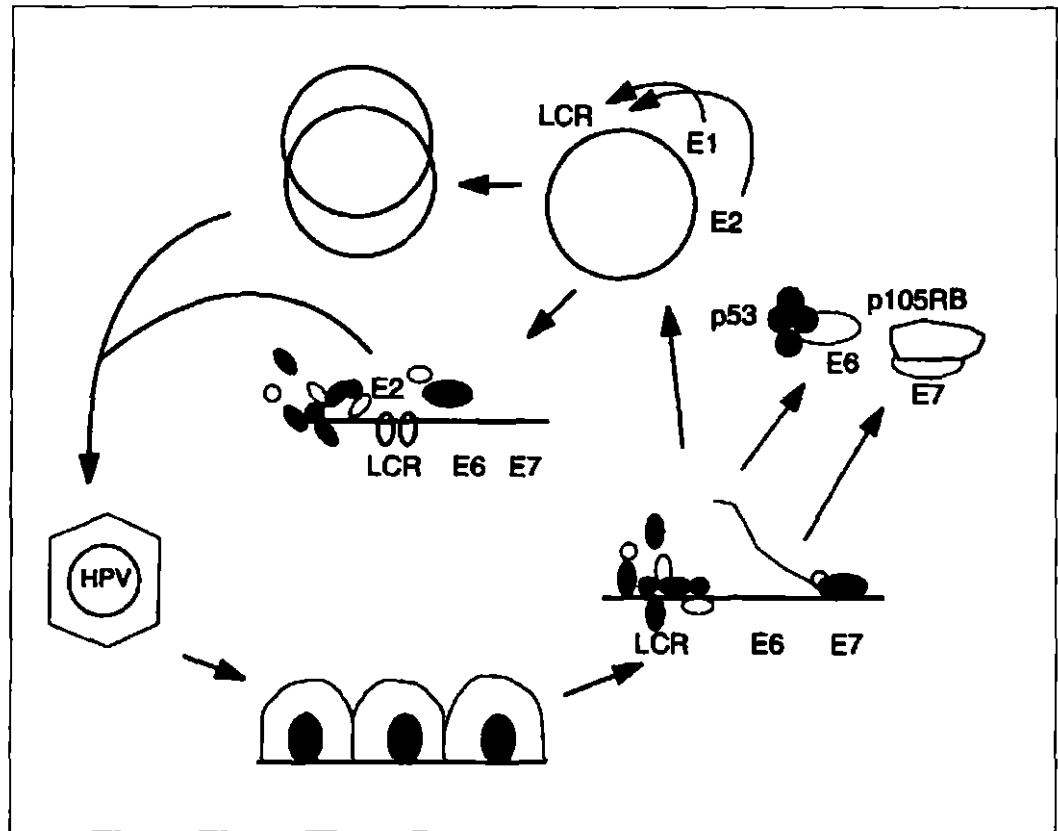


Fig 18 Ciclo de infección del VPH. Al infectar una célula basal el VPH se producen las oncoproteínas E6 y E7 las cuales interactúan con los reguladores celulares p53 y pRb105 inactivándolos. Tomado de Alvarez y Lopez 1995

El gen E6 del tipo 16 ó 18 no sólo liga a los p53 sino que inicia su degradación selectiva a través de la vía de la ubiquitina. Las proteínas de E6 y E7 de los tipos de VPH de bajo riesgo no comparten esta capacidad con el mismo nivel de eficacia. Se ha logrado identificar diecisiete variantes diferentes de E6 en las muestras analizadas a través de la secuenciación de productos de amplificación con cebadores específicos para este gen (Da Costa, *et al* 2002)

Las células de lesiones de bajo grado pueden producir grandes cantidades de virus por lo que se les llama productivas a diferencia de las de alto grado que tienen la capacidad de producir pocas copias virales. Un evento crucial en la progresión de lesiones productivas a neoplasias de alto grado es la integración del genoma viral al genoma celular (Fig. 19) lo cual tiene lugar al darse la incisión de la cadena de ADN (Middleton, *et al* 2003 Mendoza, *et al* 2007)

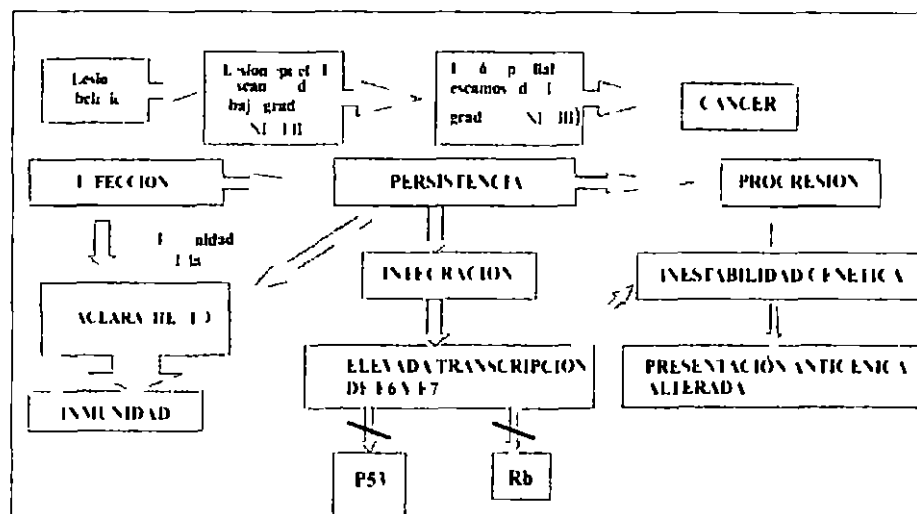


Fig. 19 Esquema de la progresión de las infecciones por VPH Middleton *et al* 2003

También se ha estudiado la región no codificadora del genoma del VPH o Region Larga Central (RLC) del VPH tipo 16 y su relación con la alta oncogenicidad de este tipo de VPH, a través de cebadores específicos y seguidos de una secuenciación directa de los productos de PCR de doble cadena. (Gagnon *et al* 2004)

La RLC contiene secuencias importantes para la regulación de la replicación viral y la transcripción de genes tempranos. La RLC del VPH tipo 18 y otros tipos de VPH genital contienen cuatro sitios de unión viral al E2 además de una única

Fig. 20 Mapa de la RLC del VPH tipo 18. Alvarez y Lopez 1995

PREVALENCIA DE GENOTIPOS DE VPH

Segun la Real Academia de la Lengua, prevalencia relacionado a epidemiología significa la proporción de personas que sufren de una enfermedad con respecto al total de la población en estudio www.rae.es/cm

En diferentes partes del mundo estudios de prevalencia del VPH revelan que los VPH tipo 16 y 18 son los de mayor presencia en muestras de tumores fijados en formalina (Pirog, *et al* 2000) seguidos por otros tipos de alto riesgo los cuales varían según la región o país en estudio (Mascareñas De Los Santos *et al* 2007) Pudimos encontrar estudios donde la prevalencia de los genotipos encontrados difiere con esta información donde encontraron que los tipos 18 y 16 se encontraron en el 4to y 5to lugar respectivamente (Levi *et al* 2002) Estudios recientes dan a conocer que la prevalencia de otros tipos como el 52, 58 y 53 en países de África, está por encima de los tipos 16 y 18 más comúnmente reportados (Sahasrabudde *et al* 2007) Estudios en otras regiones del mundo específicamente en el Sur de Taiwan revelan que el tipo 52 es el segundo tipo en prevalencia antecedido solo del tipo 16 En Ecuador se reporta el VPH tipo 52 como el más prevalente (Lin *et al* 2006)

Baldwin y colaboradores realizaron un muestreo en hombres para determinar la presencia de VPH, encontrando una prevalencia del 28.2% ellos encontraron que el tipo de VPH más común en las muestras de este estudio fue el tipo 52 (Baldwin, *et al* 2003)

Algunos autores opinan que la heterogeneidad en la distribución de los tipos de VPH en mujeres de diferentes poblaciones debería ser tomada en la medida en que fueron realizados los estudios de prevalencia en la región específica, el tipo y el

desarrollo de las técnicas de detección utilizadas así como también la sensibilidad y especificidad de los mismos (Clifford *et al* 2005)

Se ha podido establecer que los tipos de alto riesgo como el VPH tipo 16 y el 18 se encuentran con mayor frecuencia en el grupo de mujeres de menos de 20 años, mientras que en mujeres de mayor edad 40 en adelante están presentes los tipos de alto riesgo menos frecuentes (Muñoz *et al* 2004)

FACTORES DE PREDISPOSICIÓN A ADQUIRIR INFECCIONES POR VPH

Muchos autores describen los factores que predisponen a adquirir una infección por VPH (Burchell *et al* 2006 Cañadas *et al* 2004 Giuliano *et al* 2003 Schwebke 2005) entre las importantes estan

- 1 El inicio temprano de las relaciones sexuales
- 2 El cambio frecuente de parejas
- 3 Mujeres en estados de inmunosupresión, la cual eleva su probabilidad de desarrollar hiperplasia de cuello uterino hasta en 5 veces
- 4 Las infecciones recurrentes de algunos tipos de VPH considerados de alto riesgo de producir cáncer

El debut sexual temprano o los intervalos más cortos entre la menarquia, son factores de riesgo para la infección de VPH persistentes (Burchell *et al* 2006) Sin embargo las razones para esta relación son inciertas

Estudios epidemiológicos señalan que la infección con VPH es un factor de predisposición a cancer cervical independiente de cualquier otro factor. Los estudios prospectivos han mostrado que las mujeres infectadas persistentemente con VPH de tipo oncogénico tienen un riesgo de 4 veces mas de desarrollar estadios avanzados de CIN en comparación con mujeres infectadas temporalmente. Como resultado la infección de VPH persistente es considerada como un fuerte biomarcador de riesgo de cancer cervical (Cañadas *et al* 2004 Giuliano *et al* 2003)

El papel que juega la flora vaginal protegiendo al huésped de las infecciones sexualmente transmitidas (STI por sus siglas en ingles) se aprecia cada vez más. Las alteraciones significativas en el ambiente microbiológico del ecosistema vaginal

(como la que ocurren en el vaginosis bacteriana) parece ser un factor de riesgo biológico para la adquisición y transmisión de algunas STI (Schwebke 2005)

Algunos estudios informan de una incidencia superior de infección de VPH durante el embarazo pero estos resultados no se han corroborado por otros estudios similares. Una posible explicación para la incidencia mayor de infección de VPH durante el embarazo es la presencia de elementos de respuesta de la hormona del embarazo en un gen de VPH que podría activarse a través de niveles altos de esteroides. Aunque la transmisión perinatal de VPH puede causar la infección neonatal, el riesgo de morbilidad del neonato es muy bajo (Worda, *et al* 2005)

El sistema inmunológico del hospedero también tiene un papel crítico en el control de la infección por VPH. El HLA (complejo mayor de histocompatibilidad) juega un papel importante regulando la inmunidad celular mediada contra el patógeno. Las moléculas de HLA I y II son altamente polimórficas. Los individuos expresan de manera diferente los alelos de HLA lo que influye en el resultado de infección, específicamente en la relación entre la infección con un tipo de VPH de alto riesgo y el polimorfismo de HLA. A alelo A*1104, el cual incrementa el riesgo de desarrollar el cáncer cérvico uterino (Chan, D *et al* 2005)

Aunque muchas mujeres adquieren infecciones de VPH cervicales, la mayoría no progresa al cáncer cervical. Esto puede ser explicado ya que existen otros factores involucrados en el proceso del desarrollo de la enfermedad. Entre estos podemos encontrar tres grupos de potencial que son:

1. El factor medioambiental o exógeno incluyendo contraceptivos hormonales, tabaquismo, número de gestaciones y la infección conjunta con otros agentes transmitidos sexualmente.

2 El factor viral como la infección por los tipos específicos de alto riesgo la infección conjunta con otro tipo de VPH variantes de VPH carga viral y la integración viral

3 Los factores del mismo huésped incluyendo las hormonas endógenas factores genéticos y otros factores relacionados a la respuesta inmune (Muñoz *et al* 2006)

Uno de los principales factores de predisposición de cáncer cervical es la infección persistente con algún tipo de alto riesgo de VPH se sugiere que se haga la secuenciación del tipo de VPH de alto riesgo presente en la muestra de la paciente con la infección, con la finalidad de determinar si se trata de la misma cepa o si es una nueva infección, esto basados en el genoma del tipo de VPH causante de la infección (Mavrand *et al* 2000)

La infección por VPH en hombres heterosexuales ha sido muy poco estudiada, recientemente se han publicado algunos estudios donde se pone de manifiesto el rol que tiene el hombre en el desarrollo de infecciones por VPH en sus parejas femeninas ya que este contribuye significativamente a la infección y a las enfermedades cervicales subsecuentes en mujeres. Estudios científicos en mujeres con cáncer cervical y en sus maridos hace notorio que el comportamiento sexual del hombre pone en riesgo de neoplasias cervicales a sus parejas femeninas principalmente en lugares donde la incidencia de cánceres de este tipo es alta. (Ishibashi *et al* 2008)

Los hábitos sexuales del hombre, son en sí un factor de riesgo para el desarrollo de estas neoplasias. En este mismo estudio los autores encontraron una prevalencia muy alta de infecciones por VPH los resultados de este estudio fueron los siguientes la prevalencia de VPH fue más alta en Brasil (72.3%) comparada con la observada en EUA (61.3%) y México (61.9%) (Ishibashi *et al* 2008)

Otros estudios sobre pruebas de genotipificación de VPH en hombres ponen de manifiesto que la toma de la muestra es crucial en un buen diagnóstico. En un estudio en México se analizaron muestras de hombres heterosexuales con indicios de lesiones por VPH evidenciando las lesiones mediante zonas blanquecinas por ácido acético al realizar estudios por penoscopia, a estos hombres se les tomó muestra de raspado celulares de la uretra. A todas las muestras se les evaluó la calidad del ADN con la β Globina, dando como resultado que un 93.5% fueron positiva para este gen pero solo un 2% marcó positiva para infección por VPH. Llevando a los autores a la conclusión de que tomar muestras de la zona distal de la uretra es ineficaz por lo que los autores concluyen que la toma de las muestras para estudiar de VPH debe ser en el glande y el surco banal prepucial (Leyva, *et al* 2003).

Es ampliamente conocido por estudios realizados que la circuncisión en hombres es un factor de protección de adquirir infecciones de transmisión sexual (Maden, *et al* 1993, O'Farrell y Egger 2000). Existe muy poca información relacionada a esta condición con la infección por el VPH la que se tiene indica claramente que los hombres que no están circuncidados tienen más riesgo de adquirir el VPH. Se ha encontrado una disminución de riesgo de cáncer cérvico uterino en las parejas de hombres con circuncisión (Castellsagué *et al* 2002).

Dada la poca información científica de la cual se dispone y de la falta de detección de la infección por VPH en hombres la infección en estos es abrumadoramente subclínica, lo cual puede resultar en un gran número potencial de portadores asintomáticos los que sirven de reservorio y vectores del virus (Baldwin, *et al* 2003).

Algunos estudios han tratado de relacionar el hábito de tabaquismo como factor de riesgo de adquirir infecciones por VPH pero otros estudios científicos mayores no han podido relacionar esto como riesgo por si mismo (Muñoz 2004)

PREVENCIÓN DE LAS INFECCIONES POR VPH

Para ayudar a definir las estrategias de prevención del cáncer cervical es necesario contar con datos regionales específicos basados en la población en la edad y en el tipo de virus específico para población (Sukvirach S *et al* 2003)

En los últimos años se han venido estudiando dos vacunas desarrolladas por compañías farmacéuticas para la prevención de infecciones con ciertos tipos de VPH. Estas vacunas para el VPH consisten en partículas parecidas a virus (VLP por sus siglas en inglés) las cuales se someten a procedimientos especiales donde se obtienen partículas muy purificadas de la capsida L1 del virus VPH. El polipéptido L1 de VPH, se obtiene por ingeniería genética y se expresa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Kautsky *et al* 2002)

La apreciación de la prevalencia de los diferentes tipos de VPH y la patogenicidad asociada con los tipos específicos será importante en la aplicación de estrategias de la prevención basada en el uso de estas vacunas. Estudios recientes han demostrado la efectividad de estas vacunas de partículas parecidas a virus (VLP) en la profilaxis contra la infección de VPH tipo específica y la enfermedad cervical. Sin embargo, las vacunas actualmente comercializadas solo contienen VLP derivadas de sólo 2 tipos (16 y 18) ó de 4 tipos (6, 11, 16 y 18) de VPH (Luque *et al* 2006)

En la actualidad se analizan los posibles efectos de una vacuna que podría inducir regresión de lesiones de VPH establecidas, además de prevenirlas y que podría ayudar a proteger la presente generación de mujeres del cáncer cervical, además de proporcionar protección máxima para la próxima generación. Las candidatas más avanzadas para este tipo de vacuna, son las quimeras de partículas

parecidas a los virus VLP en el que se ha incorporado péptidos de proteínas tempranas como fusiones con L1 o L2. En estudios realizados se pudo determinar que las quimeras de VLP indujeron tanto la neutralización de los anticuerpos L1 y la respuesta de las células T en los polipeptidos insertados en los estudios con ratón (Schiller *et al* 2006).

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE INFECCIONES POR VPH

1 Cito morfológica

Los métodos clínicos que utiliza el médico tratante para la detección de infecciones por VPH consisten en el examen colposcópico la cito morfología y estudios histológicos de las lesiones la observación en el microscopio electrónico y la inmunquímica. La baja sensibilidad y especificidad de estas técnicas impide en muchas ocasiones el diagnóstico definitivo del VPH. Las técnicas habituales citológicas no detectan un número considerable de casos con células anormales del cuello uterino (Suárez, *et al* 2006)

Métodos como la inspección visual con ácido acético (VIA por sus siglas en inglés) también conocida como inspección visual directa (DVI) la prueba del ácido acético (AAT) o cervicoscopia, involucran el examen del cérvix al ojo desnudo por el facultativo usando una fuente de iluminación brillante después de un minuto de la aplicación con un hisopo de algodón o por rocío de ácido acético diluido al 3–5%. El descubrimiento de áreas blancas a consecuencia del ácido acético que estén bien definidas y cerca de la unión del tejido escamoso columnar indica una prueba positiva para lesiones del cuello del útero. Una de las ventajas principales del VIA es que da un resultado inmediato haciendo teóricamente posible realizar el tratamiento de lesiones anormales en la misma visita, este acercamiento es llamado diagnóstico y tratamiento sin tener que recurrir a la colposcopia o la toma de muestra histológica en las que hay que esperar el reporte citológico (Denny *et al* 2006)

En el del frotis de raspado del cuello del útero por la tinción de Papanicolaou (PAP) (Fig 21) se puede observar cambios en las células epiteliales descamadas para este propósito esta técnica tiene la limitante de no poder asegurar la presencia

del VPH en la muestra, de mostrar falsos negativos en casos de infecciones tempranas o en donde aún no son apreciables los cambios citológicos, además de no poder determinar el tipo de VPH presente en la infección y su clasificación según su riesgo de producir cáncer. En un estudio prospectivo de cohorte de seguimiento a pacientes publicado en el British Medical Journal, se destaca que las mujeres que tuvieron una citología normal al momento de su ingreso al estudio y que posteriormente desarrollaron lesiones de alto grado, en un 80% eran realmente VPH positivas cuando ingresaron al estudio en cuestión, resaltando la poca sensibilidad de los métodos citológicos. (Kjaer, *et al.*, 2002).

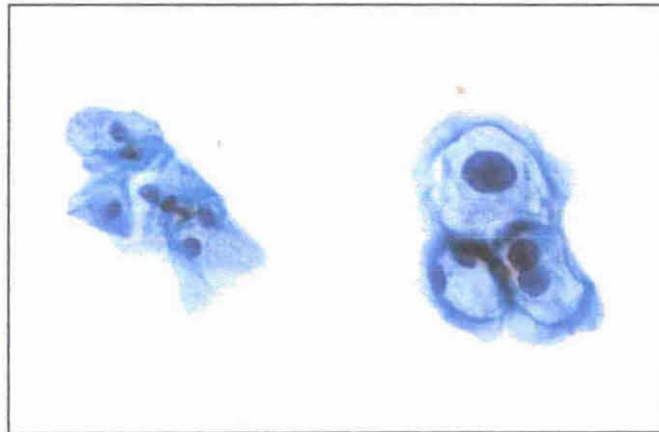


Fig. 21 Método citológico para determinación del VPH.

Los nuevos métodos comerciales de citología líquida como el Thinprep, mejoran la sensibilidad del PAP, pero siguen careciendo de poder determinar el tipo de VPH presente en la muestra o determinar si la infección es reciente o recurrente.

2 Técnicas moleculares

El diagnóstico del VPH por métodos convencionales de análisis clínicos se dificulta ya que el cultivo virológico del VPH no se puede dar y los análisis serológicos aun no están bien estandarizados y no se ha comprobado su eficacia. Hasta la fecha, el diagnóstico del VPH se ha basado enteramente en técnicas moleculares (Hubbard 2003)

El aumento de la prevalencia de infecciones por VPH se ha observado en estudios donde se usan métodos de detección más sensibles como los de PCR, que cuando se analiza la misma población estudiada previamente pero con técnicas citológicas (Herrero *et al* 2005)

Estudios longitudinales en mujeres jóvenes a las cuales se les siguió muy cercanamente demuestran que la toma de la muestra para el análisis por ADN es crucial en la detección de infecciones por VPH en muestra de hisopos tomadas adecuadamente se detectaron infecciones hasta en un 45.3% por metodología de PCR y en estas muestras los tipos de alto riesgo oncogénico se detectan en un 38.6% y los de bajo riesgo en un 19.6% (Brown, *et al* 2005)

2 a. Captura Híbrida

Es un sistema basado en la hibridación en base sólida en un micro plato el cual utiliza sondas de ARN que tienen la capacidad de hibridizar con el ADN viral en solución, estos híbridos pueden ser detectados por métodos luminiscentes. El método se basa en un coctel de sondas de ARN de 13 tipos de VPH oncogénicos que al unirse al ADN viral en la muestra, da la señal de la presencia de alguno de los 13 tipos de VPH del coctel pero no provee información tipo específica del genotipo de VPH de alto riesgo presente en la muestra. Además si la muestra contiene un tipo diferente a

los 13 incluidos en el coctel la prueba se dará como negativa, tampoco puede dilucidar si la infección es reciente o es una infección persistente (Schiffman *et al* 2002) Esta metodología ha demostrado que es más sensible en un 14% sobre el esquema de repetición de pruebas citológicas Algunos estudios científicos demuestran que la hibridación con sondas sin amplificación previa o por captura, tiene menor sensibilidad que las técnicas de PCR. (Arbyn *et al* 2005)

2 b Cebadores consenso

Basados en la secuencia del genoma del VPH se han desarrollado diferentes tipos de sondas para PCR (Fig 22) dirigidas a la region L1 del genoma viral donde se encuentran los genes tardíos de este genoma, esta región está muy bien conservada, estos son llamados cebadores consenso entre los que se destacan los llamados MY09/11 GP5 / GP6 etc En la actualidad las metodologías moleculares cuentan con cebadores específicos para el genoma del VPH por lo que se puede confirmar la presencia de este en la muestra en estudio además de poder determinar su genotipo y su riesgo de producir cancer Estas técnicas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) seguida de la acción de Enzimas de Restricción que permiten obtener patrones de bandas según el tipo del VPH, secuenciación del fragmento amplificado o las técnicas de hibridación Este último tipo tiene la ventaja de poseer una mayor sensibilidad lo cual ha sido refrendado por varias publicaciones ya que puede detectar un gran número de genotipos del VPH que infectan la zona ano genital (Chan, *et al* 2002 Brown *et al* 2005 Castel *et al* 2005 Pagliusi *et al* 2006)

Los casos de patrones de bandas ambiguos por enzimas de restricción, se pueden dilucidar mediante la secuenciación directa del producto de amplificación (Suárez, *et al* 2006 Chan, *et al* 2002) Con las técnicas moleculares se puede

ofrecer más información para el tratamiento adecuado del VPH (Sellors *et al* 2003 Hsing Pei *et al* 2004)

2 b 1 Cebadores MY09/11 Estas sondas amplifican fragmentos relativamente grandes de 450 pb (Fig 20) por lo que en muestras donde el ADN este degradado y no sea muy apto como sucede en muestras de biopsias las cuales han sido fijadas en formalina o aquellas embebidas en parafina, fallará la reaccion de amplificación La mayoría de los grandes estudios de epidemiologia y prevalencia han sido realizados con este tipo de sondas (Clifford, *et al* 2006 Muñoz, *et al* 2003) La clasificacion filogenética de los diferentes tipos de VPH se hizo en base a la secuencia de ~450 pb obtenido con estos primer de la región L1 seguido por el corte con enzimas de restriccion que brindan un patron de fragmentos que permiten determinar el tipo de VPH del que se trata. De estos cebadores se han desarrollado versiones mejoradas las cuales se les denomina PGMY09/11 (Muñoz *et al* 2003 Cañadas *et al* 2004 Clifford *et al* 2005)

Estos cebadores fallan en la detección de algunos tipos de VPH tales como el tipo 16 35 y 45 los cuales son considerados de alto riesgo (Gravitt *et al* 1998)

2 b 2 Cebadores GP5 / GP6 Algunos autores han diseñado diferentes oligonucleótidos universales complementarios a la región L1 de VPH que detectan los tipos de VPH que no se detectan con los MY09/11 este juego de cebadores amplifica un fragmento de 150 pb lo que lo hace más sensible que los MY09/11 aun en muestras degradadas (Fig 20)

2 b 3 Cebadores L1C1/L1C2 Con el propósito de aumentar la capacidad de detección del VPH, se puede emplear otros juegos de oligonucleótidos universales que amplificaran diferentes fragmentos de la región L1 de VPH se ha demostrado que

el uso de mas de un juego de oligonucleótidos universales amplia el margen de detección para este virus (Carrillo *et al* 2004)

El uso de cebadores consenso permite la detección e identificación de un espectro amplio de tipos de VPH genitales Sin embargo este es menos eficaz que la PCR de tipo específico en las infecciones multiples sobre todo cuando en una co infección, los tipos de VPH existen en una concentración baja. (Chan P *et al* 2002)

2 b 4 Cebadores específicos También se han desarrollado sondas específicas para los tipos VPH de mayor incidencia y de mayor riesgo carcinogénico En el uso de este tipo de sondas se presenta el inconveniente de que si la infección es por multiples tipos algunos se quedarán sin detectar si no se utilizan sondas para todos los tipos presentes por lo que se hace necesario el uso de Multiplex PCR

2 b 5 Cebadores SFP₁₀ Estos cebadores SFP (por las siglas del termino en inglés Short Fragment PCR) fueron diseñados para anidar en la región L1 del genoma viral del VPH, los productos de amplificación que se obtienen con estos son de 65 pb (Fig 20) se utilizan 10 juegos de cebadores los cuales se utilizan después para genotipificar el VPH presente en la muestra a través de la técnica de Hibridacion Reversa (RHA por sus siglas del inglés Reverse Hibrization Assay) la cual utiliza tiras de nitocelulosa en las cuales se han fijado sondas específicas para 23 tipos de VPH, a los cuales está dirigida esta prueba y a través de la tecnica de biotinilización, se hacen visibles cuando este se unen al cromogeno dando como resultado una banda de color morado en la posición específica para el tipo del virus presente (Fig 23)

Este tipo de prueba tiene la ventaja de que es altamente sensible por lo que aun en los casos en que la muestra esté degradada o haya poca cantidad de la misma, va ha detectar el genoma del VPH si está presente en la muestra. Es especialmente

util en aquellos casos en que se tiene que analizar biopsias o muestras embebidas en parafina.

Esta técnica posee la característica de que las condiciones de astringencia en las que se realizan las diferentes fases son altamente exigentes en cuanto a los cambios en la temperatura de $\pm 0.5^\circ\text{C}$ en la fase de hibridación resulta en la falla de esta, así cuando la temperatura es más baja de la recomendada los amplimeros no se anidan con las sondas correspondientes y cuando esta es mayor a la recomendada la hibridación es inespecífica, uniéndose los amplimeros a las sondas no correspondientes

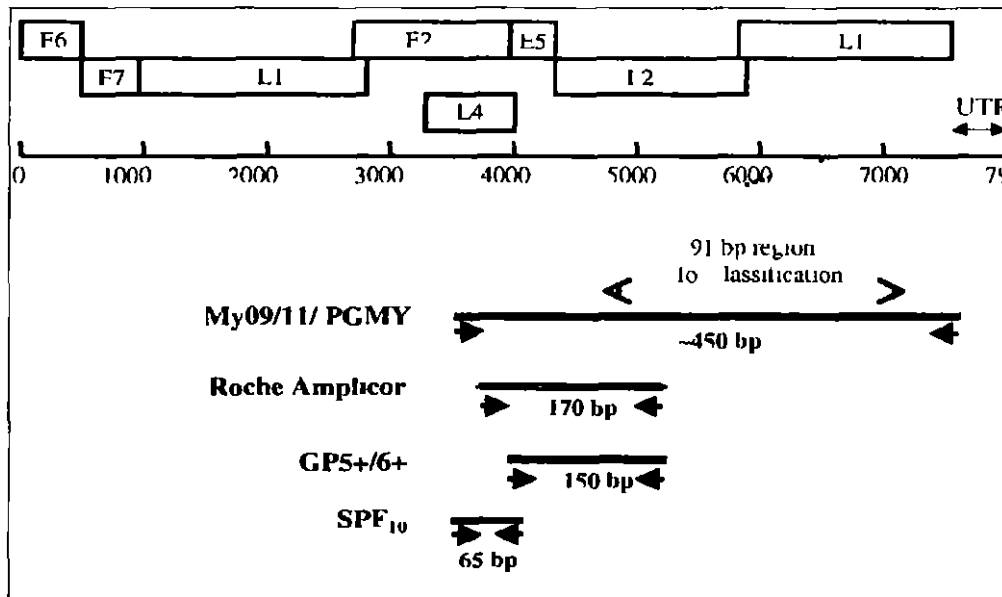


Fig 22 Sitio de anidación de los diferentes cebadores para el genoma de VPH

Una estrategia adecuada para la detección de infecciones por el VPH de manera amplia y robusta a través de PCR, es la utilización de cebadores que permitan detectar la mayor cantidad posible de tipos de VPH como los PGMY09/11 junto a los SPF₁₀ los cuales trabajan mejor en casos de muestras degradadas o en infecciones múltiples donde uno de los tipos de VPH predomina.

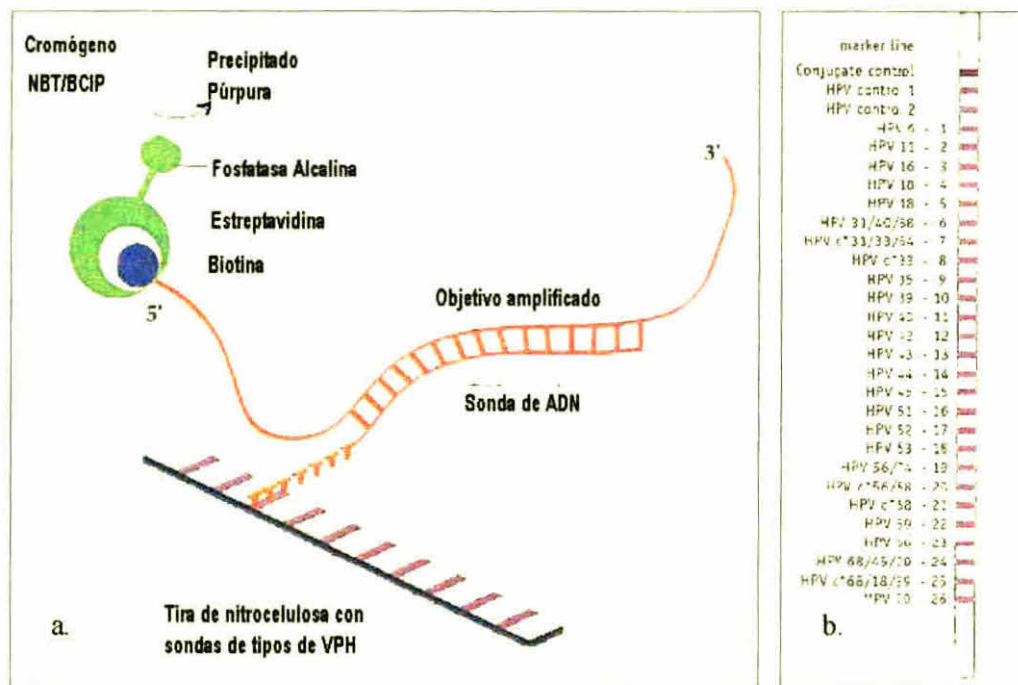


Fig. 23. a. Esquema de la técnica de Cebadores SFP₁₀ e hibridación reversa. b. resultado tiras después de la hibridación reversa. Tomado de Microgen Bioproducts Newsletters. http://www.microgenbioproducts.com/pdf/Microlab%20Newsletters/MLAB_019.pdf

PACIENTES MATERIALES Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio que se desarrolló es de corte transversal y descriptivo en la población panameña, con muestreo aleatorio en un universo de 200 pacientes femeninas panameñas de entre 15 a 60 años

La variable independiente de este estudio es el tipo de genotipo encontrado en las muestras las dependientes son la edad de las participantes condición social grado de escolaridad edad de inicio de relaciones sexuales número de parejas sexuales tabaquismo condición económica de las participantes

Este estudio es parte de un proyecto multicéntrico en el cual están participando paralelamente Honduras Guatemala, Nicaragua y Panamá. Se ha propuesto analizar un total de 500 mujeres de entre 15 y más de 60 años con la finalidad de establecer la prevalencia de los genotipos de VPH por edad en cada uno de los países y detectar tendencias de comportamiento que demuestren ser factores de riesgo asociados al peligro de adquirir de la infección con VPH

Con el propósito de cumplir con el requisito de culminar la Maestría de Ciencias Biológicas con un trabajo de investigación hemos hecho un corte en el número de participantes a 200 y hemos hecho el análisis de los datos recabados

SELECCIÓN DE PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

Para poder comenzar con el muestreo de este estudio el mismo tuvo que ser sometido inicialmente a la aprobación del Comité Nacional de Bioética (CNBI) el cual evaluó el mismo al igual que el consentimiento informado que las participantes debían firmar inicialmente antes de participar en este estudio y la encuesta con la información personal importante acerca de los patrones de comportamiento y tendencias de las participantes. El mismo fue sometido por primera vez al CNBI el 16 de Enero de 2008 y se obtiene la aprobación del CNBI en Julio de 2008.

Se invitó a participar en el estudio a mujeres panameñas desde los 15 hasta los 60 años ó más que acudieron a su cita para citología de rutina. Las mismas fueron obtenidas en el Centro de Salud de Pueblo Nuevo de la Región de Salud de Panama, en la Asociación Panameña para la Planificación Familiar (APLAFA) en la Clínica de Infertilidad del Hospital Santo Tomas y en el Centro de Rehabilitación Femenina, previa aceptación en la persona en la participación de este estudio.

La participación fue voluntaria y solo se consideraron reclutadas para el estudio las mujeres (o sus representantes legales en caso de ser menores de edad) que voluntariamente firmaron el consentimiento informado.

De esta forma, la información recabada permite calcular prevalencia de la infección por VPH así como la prevalencia de tipos específicos de VPH en particular los cancerígenos VPH 16 y 18.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

1 Inclusión

Mujeres entre 15-60 años que acudan espontáneamente a su cita de citología de rutina.

Que acepten participar en el estudio

Que firmen el consentimiento

2 Exclusión

Mujeres con sangrado genital

Con procedimientos quirúrgicos vaginales previos

Histerectomizadas

Embarazadas

Sometidas a tratamiento inmunosupresor

CONSENTIMIENTO INFORMADO Y CONSIDERACIONES ETICAS

Todas las participantes debieron leer o entender y firmar la hoja del consentimiento informado aprobado por el Comité Nacional de Bioética. El consentimiento informado incluyó detalles sobre los objetivos del estudio, beneficios y riesgos asociados con la participación en el mismo, así como compromiso para guardar la confidencialidad de la información provista (ver modelo en el Anexo). Las participantes entre 15-17 años no emancipadas necesitaron de un padre, madre, tutor o esposo que firmara el consentimiento informado en su representación. El beneficio del proyecto es para la población panameña y para las mujeres participantes en forma directa fue la tipificación gratuita del VPH causante de su infección.

ENTREVISTA DE LAS PARTICIPANTES

Cada participante de este estudio accedió a participar mediante la firma del consentimiento informado en el cual se le explicó el objetivo del estudio y los beneficios para ella, a su vez se le dio un número de teléfono al cual podía dirigirse en caso de preguntas o dudas del estudio. Además a cada participante un médico tratante o enfermera ginecológica le aplicó un cuestionario validado por la población meta que contenía preguntas dirigidas a obtener información sobre factores de riesgo para adquirir infección por el VPH. El mismo recabó información demográfica, historia clínica y reproductiva, comportamiento sexual, prácticas anticonceptivas, hábitos de tabaquismo entre otras.

La encuesta fue de fácil entendimiento, las preguntas fueron claras y la manera de llenarla se hizo a través de preguntas numeradas lo que facilitó al encuestador su desarrollo.

PROCEDIMIENTOS PARA GARANTIZAR ASPECTOS ETICOS EN LAS INVESTIGACIONES CON SUJETOS HUMANOS

Este estudio no conllevo ningun riesgo para la salud de las mujeres estudiadas ya que no se administró ningun medicamento o farmaco en el mismo. La toma de la muestra para tipificación se asemeja a la toma del papanicolaou, no produce ningun dolor o inconveniente diferente a este ultimo.

El beneficio para la paciente fue conocer si tenia la infección con VPH y el genotipo causante de la infección, especialmente si es del grupo de alto riesgo oncogénico. Esto le permitirá tomar conductas de prevención para evitar la aparición de lesiones pre-malignas o malignas.

Las pacientes no recibieron ninguna remuneración en efectivo. El incentivo fue que el estudio de tipificación fue totalmente gratuito.

La información recopilada es totalmente confidencial y solo fue manejada por los investigadores principales. Los documentos tales como los consentimientos informados y las encuestas se encuentran guardados en archivos especiales para el estudio. Se entregaron los resultados de las pruebas solo a las pacientes. Los resultados de la encuesta y genotipo serán guardados de acuerdo al protocolo y normas de atención del Ministerio de Salud en cada uno de los expedientes clínicos.

METODOS

EXTRACCIÓN DE ADN

Se analizaron 200 muestras de hisopados de cuello de útero de las pacientes reclutadas para este estudio las cuales fueron tomadas con palillos de algodón e introducidas en tubos plásticos estériles para evitar su contaminación y facilitar su transporte (Fig 24) Las muestras fueron recogidas en el Centro de Salud Rómulo Roux de Pueblo Nuevo y Betania, en el Centro de Rehabilitación Femenina de Panama, en la Asociación para la Planificación Familiar (APLAFA sede de la Locería y San Miguelito) en el Centro de Reproducción Femenina del Hospital Santo Tomás y en el Centro de Salud de Curundu Las mismas fueron transportadas en una nevera con bloques de hielo luego fueron refrigeradas a 4 °C al llegar al laboratorio donde se analizaron

Para obtener las células colectadas de cada hisopo se agregó 1.5 ml de solución salina fisiológica al tubo de plástico estéril con el hisopo de cada muestra, se dejó reposar para que se humedeciera bien el algodón con la muestra y luego se agitó en un vórtex por un minuto La solución salina con las células suspendidas se pasó a un microtubo cónico de 1.5 ml (Fig 25) y se centrifugó a 18 000 rpm por 5 minutos para coleccionar las células en un pellet Se eliminó el sobrenadante y se le dejó un remanente de unos 50 µl donde se resuspendieron las células

Al pellet de las células de cuello de útero de las pacientes se les extrajo el ADN mediante el uso del kit comercial SV Total RNA Isolation System de la casa fabricante Promega para extracción de RNA, el procedimiento del mismo fue modificado para obtener ADN

La modificación consistió en eliminar los pasos sugeridos por el fabricante que comprometerían la integridad del ADN tales como aumentar el tiempo de incubación

de la muestra a 70 ° C de 3 minutos como lo recomienda el protocolo del fabricante, a 10 minutos para asegurarnos de degradar el RNA presente en la muestra y no utilizar la DNasa del kit preservando así integro el ADN.

Todo el procedimiento se realizó en una cámara de extracción equipada con luz UV marca Labcono, Delta series purifier Class II, Biosafety Cabinet.

El ADN obtenido de cada muestra se guardó a -20° C hasta que se utilizó para el paso siguiente, es decir la amplificación con los cebadores SFP₁₀.

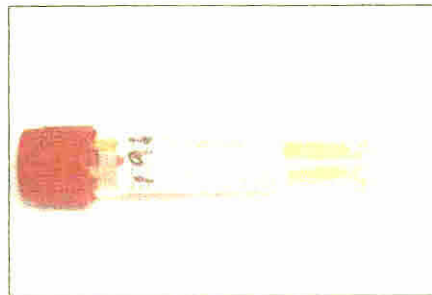


Fig. 24 Tubo con la muestra tomada en el palillo al que se le agregó solución salina fisiológica.

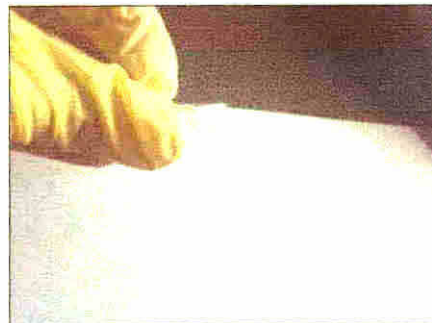


Fig. 25 Microtubo de 1.5 ml con células descamadas del cuello del útero de una de las participantes, suspendidas en solución salina fisiológica

CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Las muestras de ADN obtenidas de los hisopados del cuello uterino, fueron cuantificadas en un fotómetro, marca Biophotometer de Eppendorf (Fig. 26 y 27), haciendo una dilución 1:5 en agua destilada. La lectura se hizo a 260 y 280 nm y se observó la relación entre ambas lecturas para determinar la pureza del mismo.



Fig., 26 Biophotometer de Eppendorf, utilizado para cuantificación del ADN.



Fig. 27 Equipo utilizado para la cuantificación del ADN obtenido.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS

Para este trabajo de investigación se utilizó el principio de amplificación del genoma viral por Multiplex PCR mediante los cebadores SFP₁₀ seguido de una fase de ELISA para determinar las muestras positivas para el VPH y para la genotipificación se utilizó la técnica de hibridación reversa RHA Inno Lipa, fabricados y donados a este estudio por Lab Bio Medical Products de Holanda

CONTROL DE CALIDAD

Como requisito para participar de este estudio se nos envió un control de calidad el cual debía ser procesado y enviado para evaluar si estábamos en capacidad de desarrollar la técnica adecuadamente este consistió en 10 amplímeros desconocidos para la fase de la hibridación reversa y 30 muestras de ADN desconocidas las cuales debieron ser procesadas desde su amplificación por PCR, realizar la fase de ELISA para determinar si estaban positivos o no y luego la fase de hibridación reversa para detectar el genotipo de HPV que contenían Dichos resultados se enviaron a Labo Bio Medical Products en Holanda, país donde está la base de la casa fabricante de los reactivos utilizados para su evaluación, con resultados adecuados

AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR CON PRIMERS SFP₁₀

El ADN de cada muestra de este estudio fue amplificado con cebadores específicos para la región L1 del genoma del VPH, con la técnica de SFP₁₀ (short fragment PCR) que amplifica un fragmento de 65 pb esta técnica determina 25 diferentes genotipos de VPH incluyendo los 14 principales tipos VPH carcinogénicos (VPH16 18 31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 66 y 68)

La reacción de PCR fue realizada a un volumen final de 50 µl utilizando 10 µl del ADN extraído. La mezcla de reacción utilizada fue la prevista por el kit y descrita por Melcher *et al* 1999 la cual contiene 10 mmol/L Tris HCL (pH 9.0) 50 mmol/L KCl 2.0 mmol/L MgCl₂ 0.1% Triton X 100 0.01% gelatina, 200 µmol/L de cada dNTP 15 pmol de cada uno de los 10 juegos de cebadores marcados con biotina en la terminación 5' y 1.5 unidades de una polimerasa con inicio caliente o hot start en este caso se usó la Amplitaq Gold (Applied Biosystem) la mezcla de la reacción se colocó en un termociclador Mastercycler de Eppendorf el cual fue programado con el protocolo de amplificación sugerido por el fabricante que fue el siguiente

Una desnaturalización y activación de la enzima inicial a 94 °C por 9 min.

Luego 40 ciclos de

Fase de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos

Fase de alineamiento de 52 °C por 45 segundos

Fase de elongación de 72 °C por 45 segundos

Seguido de una elongación final de 72 °C por 5 min

Luego de la amplificación, los productos obtenidos fueron guardados a -20 °C para su procesamiento posterior. En este procedimiento los fragmentos amplificados de ADN son marcados con biotina.

VISUALIZACIÓN CON AGAROSA AL 3%

Se observó el producto de la amplificación en una agarosa al 3% buscando fragmentos de 65 pb lo cual indicó que la muestra estaba positiva para VPH.

Las muestras amplificadas por la PCR fueron utilizadas para verificar si las mismas estaban positivas para los oligonucleótidos específicos de la SFP₁₀. Esto se hizo a través de la visualización a través de un gel de agarosa grado molecular al 3% en un buffer TBE (Melcher *et al* 1999).

Las negativas para la fase de agarosa al 3% se verificaron si estaban positivas por la fase de DEIA.

FASE DE DEIA (DNA ENZYME IMMUNOASSAY)

En esta fase se analizan las muestras negativas por visualización con agarosa al 3% este sistema consiste en micro pozuelos los cuales tienen adherida a sus paredes estreptavidina la que facilita la captura de los fragmentos amplificados con las sondas SFP₁₀ los cuales tienen biotina unida a la terminal 5 estos son desnaturalizados con un tratamiento alcalino y los fragmentos son detectados por sondas marcadas con digoxigenina a la que se unen los fragmentos amplificados (Safaeian, *et al* 2007) la reacción colorimétrica se cuantifica a 450 nm Las muestras positivas se determinan al comparar el OD de cada muestra contra el de un control positivo

HIBRIDACIÓN REVERSA

Los productos biotinizados de doble cadena son desnaturalizados e incubados bajo condiciones de stringency como la temperatura la cual debe ser de 50 ± 0.5 y alcalinidad los mismos son adheridos a sondas específicas las cuales están fijadas en tiras de nitrocelulosa especiales para esto. Después de la hibridación y lavados subsecuentes los híbridos biotinizados previamente formados son detectados por la adición de un conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina, lo que genera un precipitado purpura en la tira con las sondas al incubarlas con BCIP/NBT (5 bromo-4 cloro 3 indolyl fosfato/ nitro blue tetrazolium) el cual es un compuesto químico utilizado en inmunoblot, sensible para la detección de la fosfatasa alcalina. El NBT sirve como oxidante y también da tinte azul oscuro el BCIP es el sustrato de fosfatasa alcalina. (Fig 21) El procedimiento que se siguió fue el propuesto por Melchers *et al* 1999

VERIFICACIÓN DE MUESTRAS NEGATIVAS

Todas las muestras negativas para los SFP₁₀ en la fase de DEIA y agarosa al 3% se verificaron para descartar algún tipo de inhibidor utilizando un juego de cebadores para el gen de la β Globina, el cual al ser amplificado da un fragmento de 263 pares de bases (Embury *et al* 1987) y la misma polimerasa hot start

El protocolo de amplificación para este juego de primer fue el siguiente

Una desnaturalización y activación de la enzima inicial de 95 °C por 9 min

Luego 40 ciclos de

Fase de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos

Fase de alineamiento de 55 °C por 60 segundos

Fase de elongación de 72 °C por 60 segundos

Seguido de una elongación final de 72 °C por 5 min.

Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio para esto se utilizó el pGEM de Promega como marcador de peso molecular

RESULTADOS OBTENIDOS

MUESTRAS DEL ESTUDIO

Se estudiaron un total de 200 pacientes las cuales estuvieron de acuerdo en participar del estudio, de estas la edad promedio fue de 34.1 años en un rango de 15 a 72 años. Las muestras de las pacientes de este estudio procedieron del Centro de Salud Rómulo Roux de Pueblo Nuevo y Betania en un 46.5% (93/200), del Centro de Rehabilitación Femenina de Panamá 22.5% (45/200), de la Asociación para la Planificación Familiar (APLAFA sede de la Locería y San Miguelito) 23.5% (47/200), el Centro de Reproducción Femenina del Hospital Santo Tomás 5% (10/200) y del Centro de Salud de Curundú 2.5% (5/200). (Fig. 28).

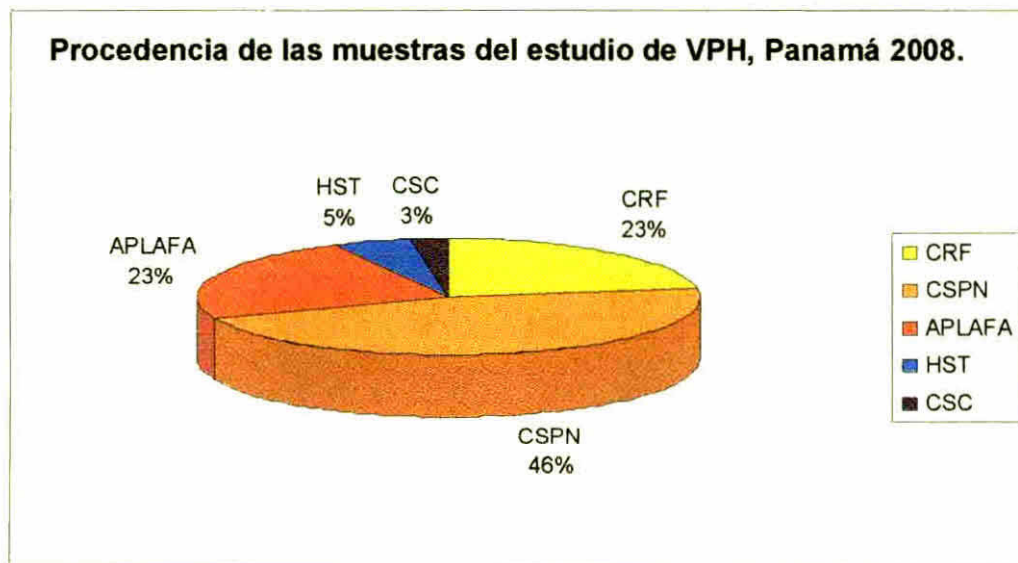


Fig. 28 Distribución de los centros de procedencia de las participantes, estudio de VPH Panamá, 2008.

Las participantes fueron clasificadas en 10 grupos etáreos (Fig. 29), cuya distribución de las edades se muestra en la siguiente tabla (Cuadro I):

15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60+	Total
16	38	37	29	12	21	19	12	6	10	200

Cuadro I Distribución por edad de las mujeres participantes del estudio de prevalencia de VPH en Panamá, 2008.

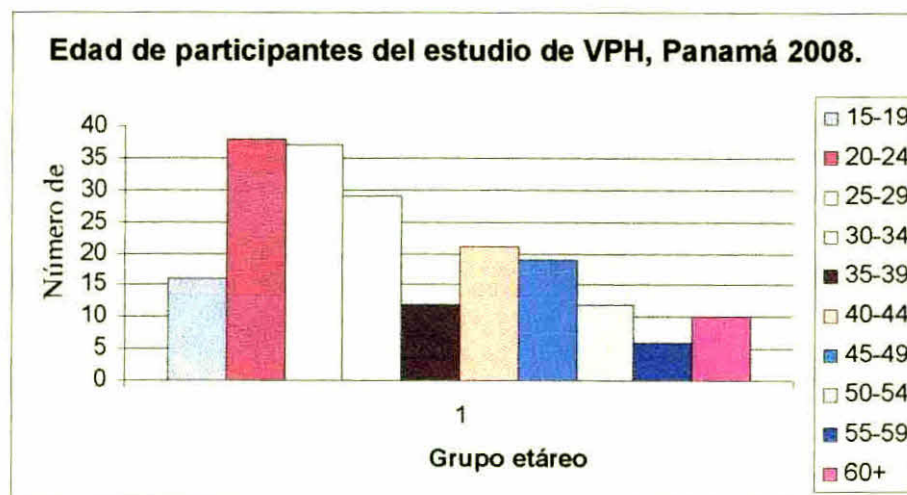


Fig. 29 Distribución del número de participantes del estudio de prevalencia de VPH en Panamá, 2008.

Algunos datos considerados como factores de riesgo en la adquisición de infecciones por el VPH le fueron preguntados a las participantes, entre los que se encuentran el inicio de las relaciones sexuales. Los datos reportado por las pacientes al ser indagadas a esta pregunta fueron de un rango entre los 13 a 33 años con un promedio entre la totalidad de las pacientes de 17.8 años. En cuanto al número de parejas sexuales a lo largo de su vida sexual activa (Fig. 30), los datos recabados fueron que el 23% (46/200) de las pacientes reportaron haber tenido solo una pareja sexual, el 47% (94/200) reportó haber tenido de 2 a 3 parejas sexuales, el 21% (42/200) de 4 a 5, el 5% (11/200) de 6 a 10, el 1% (2/200) se 11 a 20 parejas y el 3% (6/200) más de 20 sexuales. A aquellas que respondieron haber tenido más de 6 parejas sexuales se les preguntó si habían ejercido como trabajadoras sexuales, este

segmento corresponde al 9% de nuestra muestra (19/200), de las cuales solo el 21% (4/19) respondieron que sí.

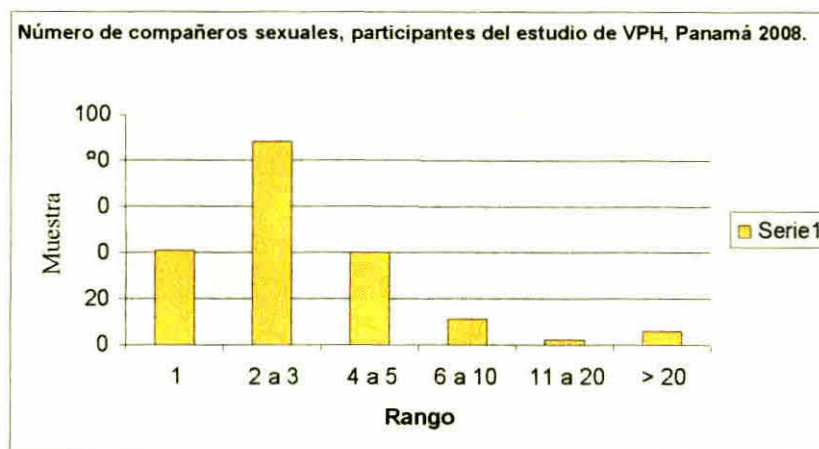


Fig. 30 Número de compañeros sexuales de las participantes.

Se les pregunto en la encuesta realizada su historia familiar con el cáncer (Fig. 31) y el 34% (68/200) respondió tener familiares con algún tipo de cáncer en contra parte el 66% (132/200) contestó que no. De las 68 pacientes que reportaron tener familiares con cáncer, el 47% (32/68) respondió que de cérvix, el 31% (21/68) de mama, 16% (11/68) de ovario y de vulva o ano sólo el 3% (2/68) respectivamente.

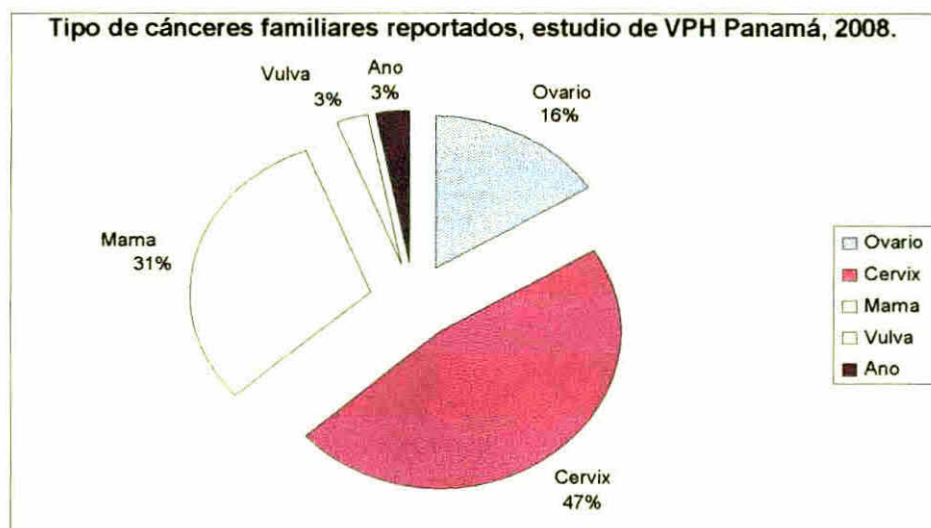


Fig. 31 Tipo de cánceres familiares que declararon las participantes estudio de prevalencia de VPH en Panamá, 2008. .

Las participantes pertenecen a diversos estratos socio-económicos de Panamá. En cuanto a los niveles de ingreso económico familiar (Fig. 32), el 48.5% (97/200) reportó ingresos menores a los USD. 400.00, el 38% (76/200) entre USD. 400.00 y 1000.00, 12% (24/200), de USD. 1000.00 a 3000.00 y el 1.5% (3/200) de USD. 3000.00 o más.

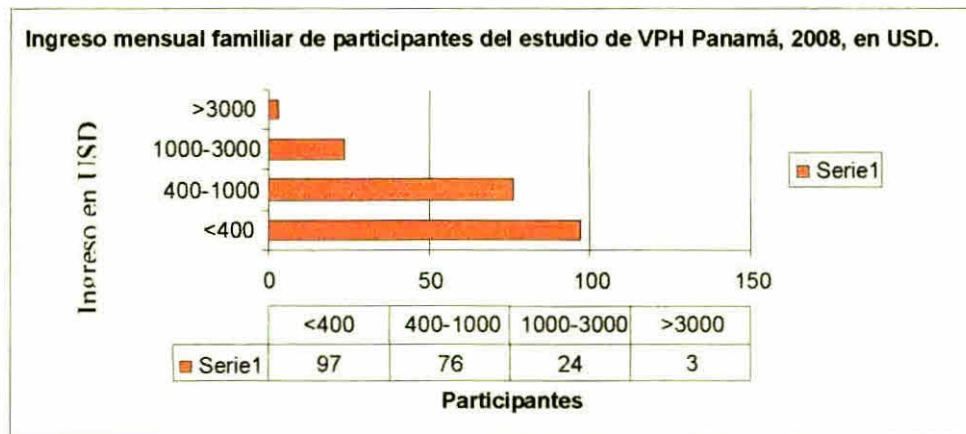


Fig. 32 Distribución por ingreso económico familiar de las pacientes.

También se les preguntó acerca de su hábito del tabaquismo (Fig. 33), el 29% (58/200) respondió haber fumado contra el 71% (132/200) de no fumadoras.

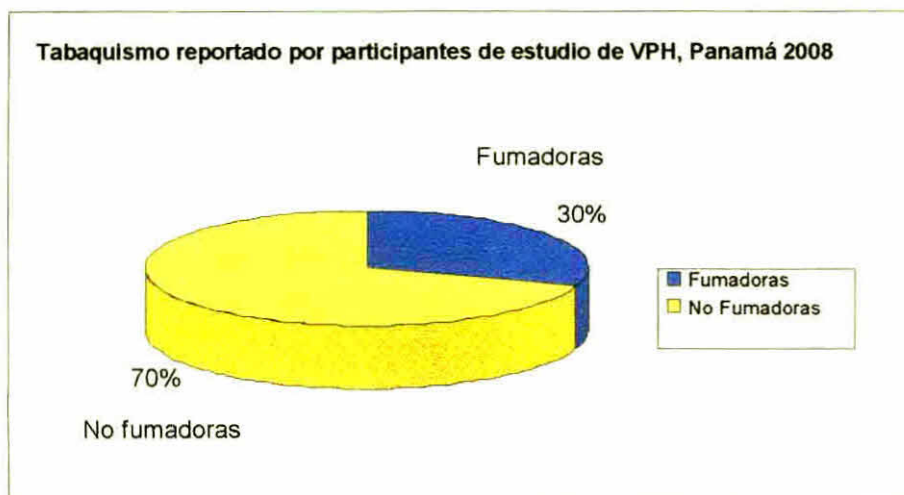


Fig. 33 Relación de mujeres fumadoras 30% vs. las no fumadoras.

En ese mismo tema, el haber cocinado con leña (Fig. 34) fue un tema de investigación a lo que las pacientes respondieron que habían cocinado con leña en algún momento de su vida en un 37% (73/200) y el 63% (127/200) respondió que no.

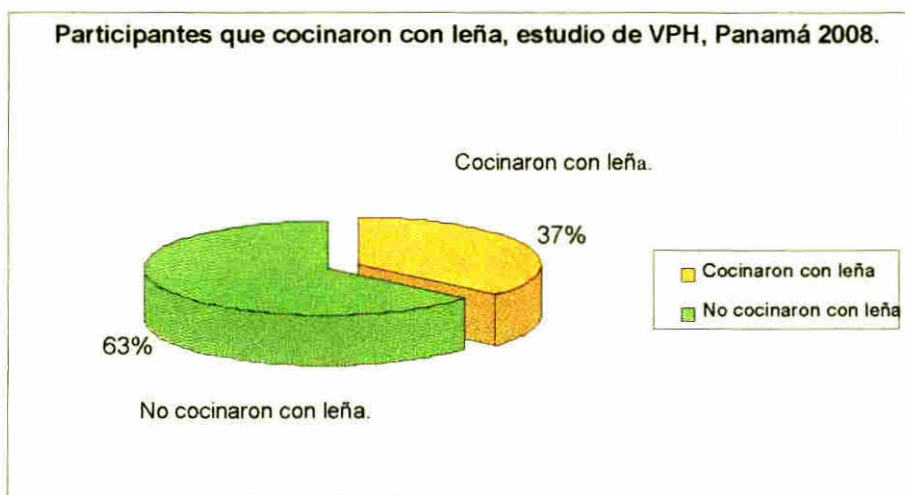


Fig. 34 Representación de aquellas mujeres que cocinaron con leña contra las que no. Estudio de VPH, Panamá 2008.

Un dato de sumo interés por ser un factor importante en cuanto a la detección temprana de las infecciones por VPH en las pacientes, fue la toma periódica de pruebas citológicas o de Papanicolau, la pregunta específicamente era para saber cuantas de estas pruebas se habían realizado a lo largo de su vida, en promedio las pacientes respondieron que entre 6 y 10 veces en su vida, pero se encontró que el 7% (14/200) no se habían realizado nunca una prueba citológica.

ANÁLISIS DE MUESTRAS POSITIVAS PARA INFECCIÓN POR VPH

A las 200 muestras de raspado de cuello de utero obtenidas en los diferentes centros de salud participantes en este estudio se les extrajo el ADN de la manera descrita en la metodología en este trabajo. El material obtenido de este procedimiento fue cuantificado para verificar la presencia, cantidad y la pureza del mismo y luego fue amplificado según el protocolo establecido. El promedio de ADN obtenido de las muestras por este método fue de 22.3 ng/ μ l y la relación 260/280 fue de 1.81 en promedio, lo que nos indicó que el material obtenido tuvo una buena cantidad y pureza para ser utilizado en nuestros análisis. A los productos de amplificación obtenidos se les realizó una detección en agarosa grado molecular al 3% (Fig. 35) con la que se obtuvieron 36% de muestras positivas, es decir 72 presentaron la banda de 65 pb.

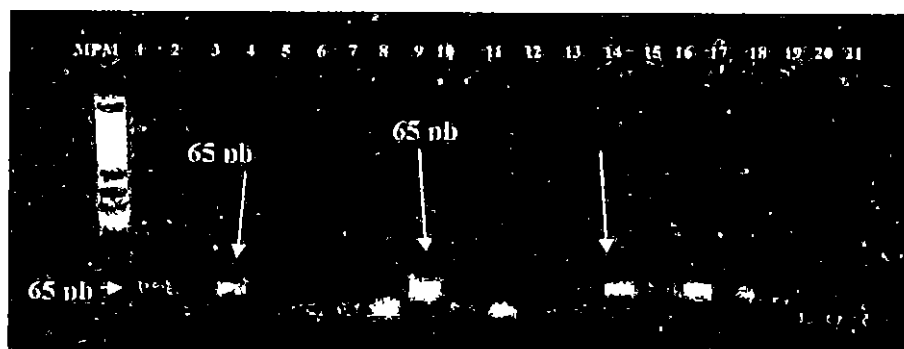


Fig. 35 Corridas de los amplímeros de SFP₁₀ en agarosa 3%. En el pocillo #1 se observa el MPM 100 pb de Promega, en los pocillos 1, 4, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se observan muestras positivas para VPH, el resto son negativas.

A todas las muestras negativas por agarosa (128 en total) se les realizó la fase de DEIA, con la cual se obtuvieron 30 positivas, más lo que elevó la prevalencia a un 51%.

FACTORES DE RIESGO EN LAS PACIENTES POSITIVAS.

Se determinó que el número de parejas sexuales de las pacientes positivas (Fig. 36), en su mayoría reportó haber tenido de 2 a 3 parejas, al igual que en la muestra total, lo que se puede observar en esta gráfica.

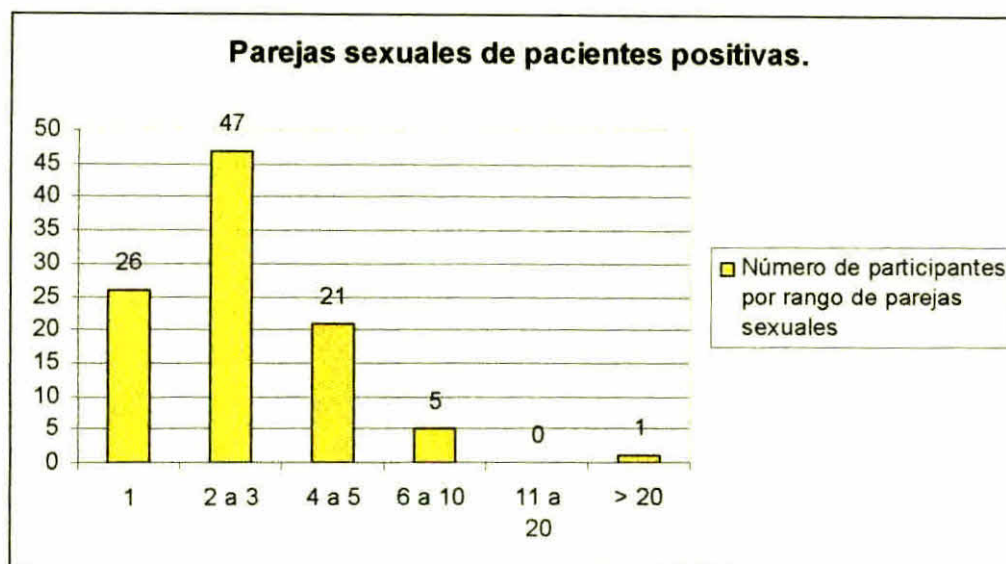


Fig. 36 Número de parejas sexuales de las pacientes positivas para estudio de VPH, Panamá, 2008.

El inicio de relaciones sexuales para las pacientes positiva se mantuvo exactamente igual que para el universo total de este estudio, en un promedio de 17.7 años y en un rango de 13 a 30 años de edad.

En cuanto a los antecedentes de cáncer familiar, las pacientes positivas para VPH reportaron en un 64% no tener antecedentes de este, 36% reportó que sí manteniéndose muy similar al universo total. De las restantes que dijeron si tener antecedentes familiares de cáncer, la mayoría respondió que algún familiar suyo había padecido de cáncer de cérvix 50% seguido por el cáncer de mama en un 33%. Las pacientes positivas que reportaron ser fumadoras fueron en total un 30%, en comparación al 70% que reportó no fumar, y en cuanto a la pregunta de cocinar con leña, el 59 % respondió que no lo había hecho nunca en su vida y el 41% si lo hizo

aunque fuera esporádicamente, a diferencia del universo total en las que las que reportaron haber cocinado con leña fue del 37%.

En promedio, las pacientes positivas reportaron haber asistido a la toma de pruebas citológicas de 6 a 10 veces, a excepción de 7 pacientes que nunca se realizaron esta prueba con antelación, al igual que el universo total de las pacientes.

En cuanto a la distribución de la prevalencia según la edad de las pacientes positivas (Fig. 37), se encontró que la mayoría de las infecciones se encuentra en los grupos de entre 20 a 24 años 20% y 25 a 29 años en un 22%, se encontró un segundo pico entre los 40 a 44 años (10%) y 45 a 49% (12%).

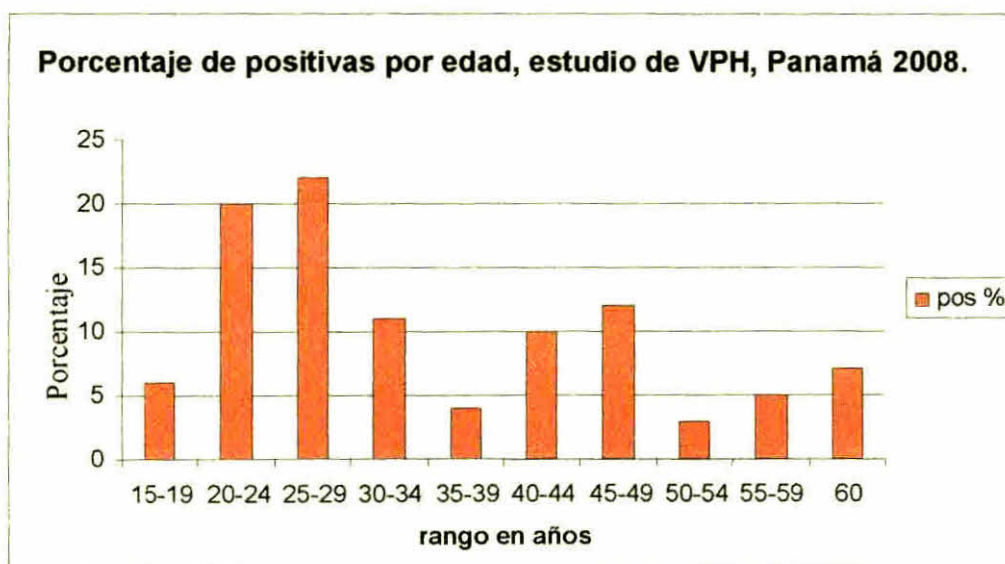
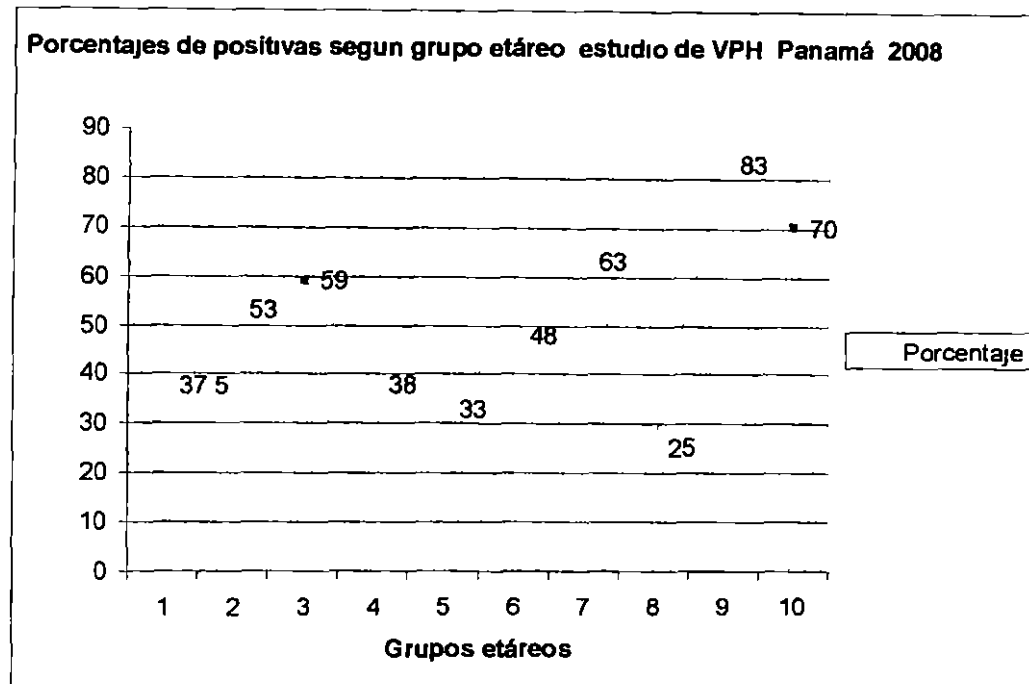


Fig. 37 Porcentaje de pacientes positivas por grupo de edad para estudio de VPH, Panamá, 2008.

Entre el grupo de 15 a 19 años el 37.5% (6/16) fueron positivas para HPV, en el grupo de 20 a 24 años 53% (20/38), las de 25 a 29 años 59% (22/37), 30 a 34 años 38% (11/29), 35 a 39 años fueron positivas en un 33% (4/12), 40 a 44 años 48% (10/21), 45 a 49 años fueron positivas 68% (12/19), 50 a 54 años 25% (3/12), 55 a 59

años en un 83% (5/6) y en el grupo de más de 60 años presentó una prevalencia de 70% (Fig 38)



Grupo etár	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Edades	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60+

Fig 38 Prevalencia edad específica de pacientes positivas del estudio de VPH Panamá, 2008

Se encontró que el 22% de las infecciones detectadas fueron con tipos únicos de VPH, el 78% de las demás tenían 2 ó más tipos de VPH presentes en las muestras. Entre las pacientes con infecciones únicas, la edad promedio de inicio de las relaciones sexuales fue de 18.8 años con un rango de 14 a 21 años. Las parejas sexuales reportadas por estas fueron de un solo compañero 18% (3/17), de 2 a 3 53% (9/17), de 4 a 5 fue de 23% (4/17) y de 6 a 10 fue 6% (1/17).

RESULTADOS DE GENOTIPOS ESPECIFICOS ENCONTRADOS

A las muestras de positivas por agarosa y DEIA, se les realizó la fase de hibridación reversa para determinar el tipo de VPH presente en la muestra, mediante la tecnica de Inno Lipa, de la cual en las muestras analizadas se pudieron determinar 235 tipos diferentes de los cuales el tipo 52 se encontro en mayor prevalencia 21% (49/200) luego el 31 en un porcentaje de 12% (27/200) el tipo 6 en un 10% (23/200) el tipo 16 y el 33 se encontraron en un 7% de las muestras (16/200) los tipos 39 53 y 74 se encontraron en un 6% (15/200) el resto de los tipos se encontraron en prevalencia mas baja del 6% y juntos completan el 25% restante de los genotipos No fueron encontrados los tipos 34 40 42 43 y 70 El VPH de alto riesgo tipo 18 en 10 de las 200 muestras (4%) Los porcentajes de los resultados obtenidos segun el genotipo encontrado fueron los siguientes (Cuadro II)

Genotipo	6	11	16	18	31	33	34	35	39	40	42	43	44	45	51	52	53	56	58	59	66	68	70	74
Numer	23	2	16	10	27	16	0	6	14	0	0	0	4	3	3	49	14	12	2	1	12	6	0	15
Porc nt j	10	1	7	4	12	7	0	3	6	0	0	0	2	1	1	21	6	5	1	1	5	3	0	6

Cuadro II Distribucion de los genotipos encontrados para estudio de VPH Panama, 2008

Se encontró que de las muestras positivas analizadas por DEIA al realizarles la hibridación reversa, 10 no presentaron ninguna banda de tincion por lo que se tomaron como negativas o el tipo presente en la infeccion no está dentro de los genotipos detectados por esta prueba, esto representa el 33% (10/30)

Se observo que las muestras positivas que se pudieron detectar en agarosa, la mayoría presentaban infecciones multiples (83%) en cambio las positivas por DEIA la mayoría fueron infecciones simples (66%) Esto nos puede dar como indicio que la

DEIA es mucho más sensible en detectar los amplímeros de SFP₁₀ que la agarosa, que tal vez requiere de un mayor número de copias presentes en el producto de amplificación para poder ser detectadas

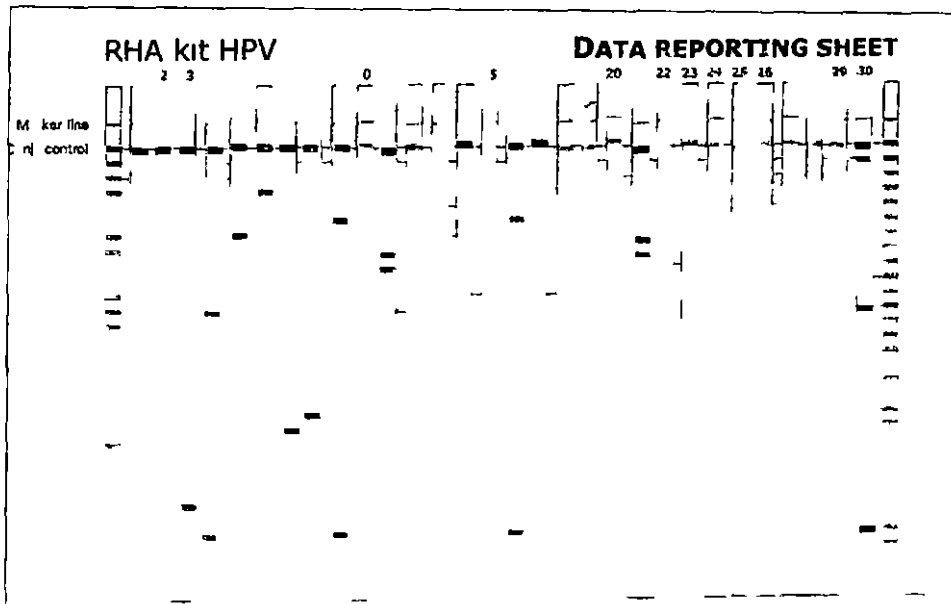


Fig 39 Tiras de RHA mostrando bandas para los genotipos encontrados

Al analizar los datos obtenidos de las tiras de Inno Lipa con las bandas encontradas detectamos que el VPH tipo 52 que es el de mayor prevalencia, se presentó en pacientes con una edad promedio de 41.7 años en cambio los VPH tipos 16 y 18 la prevalencia se dio en mujeres de menor edad en un promedio de 30.8 años (Fig 39)

RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS NEGATIVAS

Todas las muestras negativas se les amplificaron el gen de la β Globina, encontrándose solamente que 2 no presentaron el fragmento de 263 pb (Fig 40)



Fig 40 Productos de amplificación de la β Globina Todas las muestras amplificadas en esta corrida son positivas para este gen

DISCUSSION

La estrategia de una región para atacar la creciente incidencia de infecciones por el VPH y sus consecuencias de muertes por tumores de cancer cervico uterino debe comenzar con entender la epidemiologia de la infección, desde los factores de riesgo de adquirir la misma, hasta la prevalencia edad especifica de los genotipos presentes en la población de interés. En Panamá los datos sobre prevalencia de la infección por VPH datan de 1986 los mismos fueron determinados con tecnicas que no permitian la tipificación de más tipos que el 16 y 18 (Reeves *et al* 1986)

En cuanto a los factores de riesgo asociados a la adquisición de la infección por VPH en nuestro pais tampoco se conocen con certeza ya que no hay estudios que determinen cuales son

Existen diferentes metodos para la detección y genotipificación de este virus todos ellos tienen sus ventajas y desventajas por lo que escoger el tipo de método molecular utilizado en este estudio se basó en la sensibilidad, especificidad y habilidad de genotipificar varios tipos de VPH de manera masiva. En este estudio decidimos utilizar la metodologia de PCR por SFP₁₀ seguida por hibridización reversa, ya que en caso de que la muestra esté positiva para el genoma del VPH permite genotipificar 25 tipos de este virus en la fase de hibridización reversa de manera masiva. (Melchers *et al* 1999) Aunado a esto podriamos decir que otros métodos tales como el uso de los cebadores MY09/11 tienen la ventaja de genotipificar más tipos de VPH pero son menos sensibles en casos de muestras escasas o degradadas y falla en tipos de alto riesgo como el 16 35 y 45 (Gravitt *et al* 1998)

La toma de la muestra a través de hisopos de madera con punta de algodón y transportadas en tubos esteriles demostro ser un método bueno para esto ya que todas las muestras tomadas de esta manera se preservaron de manera adecuada y al

extraerles el ADN este resulto estar en una concentración y pureza adecuadas para el estudio En cuanto al método utilizado para la extracción del ADN de las muestras las modificaciones hechas al protocolo del kit comercial de Promega para la extracción de RNA, permitió la obtención de ADN en buena concentración y en grado de pureza, esto lo pudimos corroborar al amplificar las muestras para el gen de la β Globina.

En cuanto a los factores de riesgo de adquisición de infección de VPH el inicio temprano de las relaciones sexuales así como tener varias parejas sexuales parece ser un factor de riesgo en las participantes de este estudio lo que esta en concordancia con lo descrito en estudios previos (Burchell *et al* 2006 Cañadas *et al* 2004 Giuliano *et al* 2003 Schwebke 2005) aunque algunas pacientes positivas para infección con VPH con tipos considerados de alto riesgo reportaron solo haber tenido una sola pareja sexual con inicio tardío de las relaciones sexuales Esto podría dar a entender que un factor de predisposición importante podría ser el comportamiento de la pareja sexual si la misma está positiva para la infección y el tipo de VPH que le está infectando En este estudio no se contempló la información sobre el comportamiento sexual de las parejas de las participantes pero como está descrito en estudios recientes el comportamiento sexual de la pareja masculina en sí es un factor de riesgo para adquirir infecciones por VPH (Ishibashi *et al* 2008)

Los antecedentes de tabaquismo no han sido demostrados como factores de riesgo para la adquisición de la infección por VPH (Muñoz *et al* 2004) en nuestro análisis tampoco pudimos demostrar esta relación entre el fumar y la infección con VPH al comparar entre el universo de la muestra total y las pacientes positivas para VPH ya que se mantuvieron en porcentajes similares las pacientes que declararon haber cocinado con leña en el universo total fue de un 37% mientras que en las que

dieron positivas para VPH fue de un 41%. Por lo que el tabaquismo o cocinar con leña no parecen ser un factor de riesgo en la población panameña para la adquisición de VPH. Lo mismo se podría decir de la relación de antecedentes de cáncer familiar en el universo total fue de un 34% y este porcentaje en las pacientes positivas fue del 36%.

La prevalencia de VPH en las muestras estudiadas de raspado cervico uterino encontrada en este estudio es del 51% (102/200) de las pacientes que llegaron a realizarse la prueba citológica de rutina. Este valor se encuentra acorde a la prevalencia esperada según la literatura disponible (Levi *et al* 2002, Dunne *et al* 2007) aunque en estudios recientes se ha encontrado prevalencia de hasta un 83% lo que difiere a la encontrada por nosotros (Clifford, *et al* 2003, Kitchener *et al* 2006).

Encontramos que los grupos etáreos estudiados de 20 a 24 años y 25 a 29 años se encontró una alta prevalencia de infección por VPH pero la mayor prevalencia se encontró en el grupo etareo de 55 a 59 años con un 83% de pacientes positivas seguido por el grupo de más de 60 años con un 70%. Este tipo de aparición bimodal de dos picos de mayor prevalencia concuerda con lo que han reportado estudios científicos previos en Costa Rica, Colombia y Canadá entre otros (Muñoz, *et al* 2004, Bosch *et al* 1995, Sells *et al* 2003). Podríamos decir que en el caso de las pacientes más jóvenes se puede tratar de que aun no tienen una pareja estable lo que contribuye al cambio de parejas sexuales con más frecuencia que el grupo de pacientes de 30 a 55 años en donde por lo general la mujer ya ha encontrado una situación sexual con una sola pareja. El otro pico de prevalencia en pacientes de más de 55 años puede deberse a la menor asistencia a sus controles de salud o que la relación con su pareja terminó o esta ha encontrado más parejas sexuales.

En cuanto a los genotipos encontrados la mayor prevalencia fue encontrada para el VPH tipo 52 seguida por el tipo 31. Esto difiere a lo reportado en la mayoría de las regiones geográficas estudiadas tales como América del Norte y Europa, pero se asemeja a los resultados encontrados en algunas regiones de África, Sur América y el Sur de Taiwán (Sahasrabudde *et al* 2007 Lin, *et al* 2006 Levi *et al* 2002). Otros estudios ya han reportado prevalencia diferentes a las que indican mayor número de casos para infecciones con los tipos VPH 16 y 18 (Mascareñas De Los Santos *et al* 2007). Un factor que puede estar incidiendo en los resultados encontrados por nosotros es la edad de la población estudiada, ya que los tipos de alto riesgo como el tipo 16 y 18 se ha encontrado según los estudios consultados en pacientes de menos de 20 años grupo etario con pocas participantes en nuestro estudio. En nuestros datos encontramos que el grupo de pacientes de 40 años para arriba, son las que presentaron con mayor frecuencia el tipo 52 lo que concuerda con lo que se ha reportado en publicaciones científicas donde se puede verificar que la mayor frecuencia de aparición de este tipo es en pacientes de más edad y en hombres (Lin *et al* 2006 Baldwin *et al* 2003).

El uso de agarosa para la detección de las muestras positivas fue una alternativa al protocolo del fabricante ya que en el momento de realizar la fase de DEIA no contábamos con la sonda necesaria para esto. Se decidió utilizar agarosa al 3% ya que el fragmento esperado cuando la muestra es positiva es de apenas 65 pb. Se pudo comprobar que la utilización de la agarosa como método de detección de muestras positivas por PCR, no es tan efectiva o sensible al ser comparada con la de DEIA sobre todo en muestras con infección de un solo tipo de VPH. En muestras con coinfección de varios tipos de VPH la detección con agarosa fue buena. Con la técnica de DEIA se pudo detectar algunas muestras positivas que con la agarosa no se

pudo observar la banda de 65 pb pero por otro lado se encontraron muestras positivas con esta tecnica, que no presentaron bandas en la tira de hibridizacion lo que significa que estaban negativas para infección con VPH o que el genotipo presente no se encuentra entre los que permite detectar esta metodologia.

La técnica de PCR con cebadores SFP₁₀ seguida de hibridación reversa, demostró ser una técnica lo suficientemente sensible y específica para la detección y genotipificación del VPH. Se determinó que en las pacientes positivas para la infección por VPH, el 22% estaban infectadas por un solo tipo de VPH y el resto (78%) tenían infecciones múltiples.

De las muestras positivas detectadas por agarosa, el 83% fue por infecciones múltiples. Esto se determinó al momento de hibridizar el producto de amplificación de la muestra con los cebadores SFP₁₀. Al analizar por DEIA las muestras negativas por agarosa, pudimos determinar que la mayoría de estas que dieron positivas por esta técnica estaban infectadas por un solo tipo de VPH (66%).

CONCLUSION

Como conclusión de este estudio podemos decir que el comportamiento y el inicio de la actividad sexual de las mujeres en edades tempranas así como el comportamiento pasado y actual de su pareja sexual son un riesgo de adquisición de la infección por VPH. No pudimos relacionar el fumar, cocinar con leña, los antecedentes familiares de cáncer o el nivel socio-económico como factores de riesgo para esta infección.

En cuanto a la prevalencia de genotipos encontrada en este análisis debemos completar la muestra de 500 pacientes y así analizar los diferentes grupos étnicos. Con esta información se complementará la ya obtenida en el corte inicial de 200.

El genotipo 52 seguido del 31 ambos de alto riesgo fueron los más prevalentes en las muestras analizadas en este estudio, seguidos del genotipo 6 que está clasificado como de bajo riesgo.

La mayor prevalencia del VPH tipo 52 encontrada en este estudio puede deberse a que la mayor prevalencia fue encontrada en mujeres de más de 50 años; esto puede ser consecuencia de los cambios en el comportamiento sexual probablemente de la pareja de las pacientes o de ella misma.

Los tipos 16 y 18 fueron encontrados mayormente en mujeres de menor edad que las que presentaron el tipo 52; esto puede servir para diseñar el esquema de vacunación por parte del Ministerio de Salud en la población panameña.

La diferencia entre los genotipos más prevalentes encontrados en los diferentes estudios puede deberse tal y como lo sugieren algunos autores a los métodos de detección utilizados, ya que se sabe que difieren en sensibilidad y algunos fallan en la detección de algunos genotipos.

El método de PCR con cebadores SFP₁₀ con hibridación reversa resultó ser eficiente para la genotipificación masiva de los tipos de VPH encontrados en la muestra analizada en este estudio

RECOMENDACIONES

Quisiéramos recomendar al concluir este estudio que se estableciera la detección del VPH de manera rutinaria por métodos moleculares y que no solamente a las mujeres se les realice la pruebas para la detección del VPH sino que el hombre como portador asintomático también ya que este debiera conocer si tiene la infección y que genotipos porta a través del tamizaje por pruebas para VPH por ADN

Además se necesitan más estudios sobre infecciones por el VPH, sobre todo en hombres lo que permitirá determinar con exactitud los factores de riesgo de adquirir el VPH en nuestra población.

Se está por comenzar un gran estudio en Panamá, con una muestra de 6000 mujeres con la que se pretende dilucidar muchos aspectos sobre la epidemiología de la infección con este virus los factores que predisponen a la adquisición de este en nuestra población y generar datos para la aplicación de la vacuna del VPH en el mismo se debería incluir la determinación de la prevalencia del VPH en la población masculina y los hábitos de ellos que incrementen el riesgo de la adquisición de esta infección.

Una recomendación final sería la de estandarizar el método de detección en los diferentes países para así poder determinar sin sesgos la verdadera prevalencia de la infección y los genotipos más comúnmente encontrados

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 Alvarez, L y López, E 1995 Regulación genética de los papillomavirus humanos genitales Salud Publica Mexicana 37 240 247
- 2 Arbyn, M Paraskevaidis E Martin-Hirsch, P Prendiville W y J Dillner 2005 Clinical utility of VPH-DNA detection Triage of minor cervical lesions follow up of women treated for high grade CIN An update of pooled evidence Gynecologic Oncology 99 (3) 7 11
- 3 Arosemena, J Guerrero M Causay D Cuevas M Loo de Lao S Reeves W 1987 Prevalencia de Infecciones de Endocervix con el Virus del Papiloma Humano en una Población de Prostitutas de la Ciudad de Panamá Revista Médica de Panamá, 12 (3) 165 172
- 4 Avian papillomaviruses the parrot *Psittacus erithacus* papillomavirus (PePV) genome has a unique organization of the early protein region and is phylogenetically related to the chaffinch papillomavirus [en linea, acceso 15 de noviembre de 2008]
<http://www.vet.uga.edu/vpp/ivcvm/1998/stedman/index.php>
- 5 Baltimore D 1971) Expression of animal virus genomes Bacteriol Rev 35 (3) 235-41 PMID 4329869
- 6 Baldwin, S Wallace D Papenfuss M Abrahamsem M Vaught L Konegay J Hallum J Redmond S Giuliano A. 2003 Human Papilloma in Men Attending a Sexually Transmitted Disease Clinic The Journal of Infection Disease Abril 1 187 1064 1070
- 7 Bosch, X Manos M Muñoz N Sherman, M Jansen, A Peto J Schiffman, M Moreno V Kurman R Keerti S International Biology Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group (1995) Prevalence of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer a Worldwide Perspective J of Natl Cancer Inst 87 (11) 796 802
- 8 Brown, D Shew M Qadadri B Neptune N Vargas M Tu, W Juliar B Bree T y Fortenberry J 2005 A Longitudinal Study of Genital Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Closely Followed Adolescent Women The Journal of Infectious Diseases (191) 182 192
- 9 Burchell A Winer R, Sanjosé S y Eduardo L Franco 2006 Chapter 6 Epidemiology y transmission dynamics of genital VPH infection Vaccine 21 Agosto 24 (3) 52-61
- 10 Brenes M Loo de Lao S Gómez, B Reeves W y Grupo Multnacional de Estudio del Cáncer Cérvico uterino en América Latina. 1987 Revista Medica de Panama, 12 (3) 173 181
- 11 Brown, D Schroeder J Bryan, J Stoler M y Fife K (1999) Detection of Multiple Human Papillomavirus Types in Condylomata Acuminata Lesions from Otherwise Healthy and Immunosuppressed Patients J Clin Microbiol Octubre 37(10) 3316-3322
- 12 Campos M 1995 Infection by bovine papillomaviruses and prospect for vaccinations Trends of Microbiology 3 92 97
- 13 Cannistra, S y Niloff J 1996 Cancer of the Uterine Cervix The New England Journal of Medicine 16 (334) 1030-1037
- 14 Cañadas M Bosch X Junquera M Ejarque M Font R Ordóñez E Sanjosé S 2004 Concordance of Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Anogenital and Oral Infections in a High Risk Population J Clin Microbiol jae Marzo 42(3) 1330-1332

- 15 Castle P Schiffman, M Herrero R, Hildesheim, A Rodriguez, A Bratti C Sherman, Wacholder M Tarone R y Burk, R. 2005 A Prospective Study of Age Trends in Cervical Human Papillomavirus Acquisition and Persistence in Guanacaste Costa Rica. *The Journal of Infectious Diseases* 191 1808 1816
- 16 Castellsangüé X Bosch, X Muñoz, N Meijer C Shah, K, de Sanjosé, S Eluf Neto J Ngelangel N Chichareon, S Smith J Herrero R, Moreno V Franceschi S para la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer del Grupo Multicentrico para el Estudio del Cáncer Cervical 2002 Male Circumcision, Penile Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer in Female Partners *The New England Journal of Medicine* Abril 11 343 (15) 1105 1112
- 17 Chan, D Cheung, T Tam, A Cheung, J Yim S Lo K, Siu, N Zhou, D y Chan, P 2005 Risk Association between Human Leukocyte Antigens-An Allele and High Risk Human Papillomavirus Infection for Cervical Neoplasia in Chinese Women *The Journal of Infectious Diseases* 192 1749 1756
- 18 Chan, P Chang A Cheung J Chan, D Xu L Tang, N y Cheng A 2002 Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection Differences between High and Low Oncogenic Risks Types *The Journal of Infectious Diseases* 185 28 35
- 19 Chan, SY Delius H Halpern AL Bernard HU (1995) Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types uniting typing phylogeny and taxonomy *J Virol* 69 3074–3083
- 20 Clifford G M Smith J S Plummer M Muñoz, N y Franceschi S 2003 Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide a meta analysis *British Journal of Cancer* 88 63 73
- 21 Clifford G M Herrero R, Muñoz, N Snijders PJ Vaccarella, S Anh, P T H Ferreccio C Matos E Molano M RajKumar R, Ronco R, De Sanjosé S Shin, H R, Sukvirach, S Thomas J O Tunsakul S Meijer C J Franceschi S and the IARC HPV Prevalence Survey Study Group 2005 Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys a pooled analysis *The Lancet* September 17 (366) 991 998
- 22 Clifford G M Gallus S Herrero R, Munoz N Snijders P Vaccarella, S Anh, P Ferreccio C Hiev N Matos E Molano M Rajkumar R, Ronco G de Sanjose S Shin H Sukvirach S Thomas J Tunsakul S Meijer C Franceschi S y el IARC HPV Prevalence Survey study Group 2005
- 23 Clifford G Franceschi S Díaz M Muñoz, N y Villa, L 2006 Vaccine Chapter 3 HPV distribution in women with and without cervical neoplastic diseases *Agosto* 24 (3) S26 S34
- 24 Da Costa, M Hogeboom, Ch Holly E y Palefsky J 2002 Increased Risk of High Grade Anal Neoplasia Associated with a Human Papillomavirus Type 16 E6 Sequence Variant *The Journal of Infectious Disease* 185 1229 1237
- 25 Deluca, D Alonso J Alcalá, M Lucero R y Diaz, Nicolás 2004 Estudio citológico y molecular por infección por virus de Papiloma Humano en aborígenes de la etnia Pilagá del noreste de Formosa. *Universidad del Nordeste de Argentina Resumen* M 027
- 26 Denny L Quinn, M y Sankaranarayanan R. Chapter 8 Screening for cervical cancer in developing countries *Vaccine* Agosto 21 24 (3) S71 S77

- 27 Dunne E Unger E Sternberg M McMillan G Swan D Pate S Markowitz L et al. 2007 Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States JAMA, February 28 296 (8) 813-819
- 28 Embury S Scharf S Saiki R Gholson M Golbus M Arnheim N y Erlich H 1987 Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis The New England Journal of Medicine Marzo 316(11) 656-661
- 29 Ferenczy A Coutlée F Franco E y Hankins C (2003) Human papillomavirus and HIV co infection and the risk of neoplasias of the lower genital tract a review of recent developments CMAJ Septiembre 2 169(5) 431-434
- 30 Franco E Duarte Franco E Ferenczy A 2001 Cervical cancer Epidemiology prevention and the role of human papillomavirus infection CMAJ April 3 164 (7)
- 31 Gagnon S Hankins K Tremblay C Forest P Pourreaux K y Coutlée F 2004 For the Canadian Women's HIV Study Group Viral Polymorphism in Human Papillomavirus Types 33 and 35 and Persistent and Transient Infection in the Genital Tract of Women The Journal of Infectious Diseases 190 1575-1585
- 32 Giuliano A Siegel E Roe D Ferreira S Baggio M Galan L Duarte-Franco E Villa L Rohan T Marshall J y Franco E 2003 Dietary Intake and Risk of Persistent Human Papillomavirus (VPH) Infection The Ludwig McGill VPH Natural History Study The Journal of Infectious Diseases 188 1508-1516
- 33 Gravitt P Peyton C Apple R and Wheeler C 1998 Genotyping of 27 human papillomaviruses types using L1 consensus products by a single hybridization, reverse line blot detection method Journal of Clinical Microbiology 36 3020-3027
- 34 Goldie S Kim J and Myers Chapter E 2006 Cost effectiveness of cervical cancer screening Vaccine Volumen 24 Suplemento 3 Agosto 21 S164-S170
- 35 Herrero R Castle Ph, Schiffman M Bratti M Hildesheim A Morales J Alfaro M Sherman M W ch ld Sh Chen S Rodríguez A y Burk R. 2005 Epidemiologic Profile of Type-Specific Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia in Guanacaste Costa Rica The Journal of Infectious Diseases 191 1796-1807
- 36 Herrero R, Hildesheim A y Bratti C 2000 Population based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. J Natl Cancer Inst 92 464-74
- 37 Historias de la medicina, Francis Peyton Rous (visto en línea 15 de noviembre 2008)
<http://historiadelamedicina.org/rous.htm>
- 38 Hsing Pei L Yang Yang Y Hsueh Yin W Jau Tsuen K. 2004 Method for Testing for Human Papillomavirus Infection in Patients with Cervical Intraepithelial Disease Clin Microbiol January 42(1) 366-368
- 39 Hubbard R. 2003 HPV Testing Method Archives of Pathology lab Medicine August 124 (1) 939-945

- 40 ICTVdB Management 2006 The Universal Virus Database version 4
Buchen Osmond C (Ed) Columbia University New York, USA (visto en línea 17 de noviembre de 2008)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>
- 41 Ishibashi M, Antunes J, Aoki M, R Terreni R, Brito E, Carvalho Silva, R, Cunha, R, Da Silva F, Araujo F, Souza, M, Souza, V, Delgado R, Fietzek² Galan, B, Gonçalves J, Hessel R, Lima Bocalon, R, Martinez Otero R, Relvas V, Grabas Ribeiro M, Ribeiro Vitoree L, Serrao Azevedo C, Villa L, Matsuo R, Abrahamsen, M, Baggio ML, Eyring K, Flores R, Gage C, Giuliano A, Jolles E, Kay K, Lee JH, Papenfuss M, Smith, D, Wolf K, Alvear J, Valdez, A, Díaz, G, Gutiérrez S, Hernández, M, Herrera, N, Landa, A, Lazcano Ponce E, Pasáran A, Quiterio M, Rodríguez, A, Rodríguez, A, Rojas O, Román, P, Salazar D, Salmerón, J. 2008 Human Papillomavirus infection in men residing in Brazil, Mexico and the USA. *Salud Publica Méx*. 2008. Vol. 50(5): 408-418.
- 42 Kleter B, van Doorn, L, Shegget J, Shraugen, L, van Krimpen, K, Burger M, Harmsen B and Quint W. 1998. Novel short fragment PCR assay from highly sensitive broad spectrum detection for anogenital human papillomaviruses. *American Journal of Pathology*. Diciembre 156 (6): 1731-1740.
- 43 Kitchener H, Castle P y Cox J. 2006 Chapter 7. Achievements y limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*. Agosto 24 (3): 63-70.
- 44 Kjaer S K. 2002. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (VPH) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in younger women: population based prospective follow up study. *British Medical Journal* 325(7364): 572.
- 45 Koutsky L, Ault, K, Wheeler C, Brown D, Barr E, Alvarez, F, Chiacchierini L, Jansen, K. 2002. For the Proof of Principle Study Investigators. A Controlled Trial of a Human Papillomavirus Type 16 Vaccine. *The New England Journal of Medicine*. Noviembre 21 (21): 347-351.
- 46 Lacey Ch, Lowndes C y Shah, K. 2006 Chapter 4. Burden and management of non cancerous VPH related conditions. *VPH 6/11 disease Vaccine*. Agosto 21 (3): 35-41.
- 47 Levi J, Ketter B, Quint W, Fink, M, Canto C, Matsubara, R, Linhares I, Segurado A, Vanderborght, B, Eluf Neto J, Van Dorp, L. 2002. High Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infection and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in HIV Infected Women in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. Septiembre 40(9): 3341-3345.
- 48 Leyva, A, Aranda, C, Conde C, Lazcano E. 2003. *Salud Publica de México*. Mayo 20 (5): 589-593.
- 49 Lin, H, Yen Ying, MA, Jau Sung, M, Yu Che, O, Shu Yun, S, Chan Chao Ch. 2006. High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan. *Gynecologic Oncology*. 101 (1): 40-45.
- 50 Lowry D, Schiller J. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(5): 1167-1173.
- 51 Luque A, Jabeen M, Messing S, Lane C, Demeter L, Rose R y Reichman, R. 2006. Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes and Related Abnormalities of Cervical Cytological Results among HIV 1-Infected

- Women in Rochester New York The Journal of Infectious Diseases Vol 194 428-434
- 52 Maden, C Sherman, K, Beckman, A Hislop T G Thex, Ch Rhoda, A, Daling, J 1993 History of Circumcision, Medical Condition, and Sexual Activity and Risk of Penil Cancer Journal of the International Cancer Institute Enero 6 85 (1) 19 24
 - 53 Mayrand M H, Coutlée F Hankins C Lapointe N Forest, P Ladurantaye M Roger M y The Canadian Women's HIV Study Group 2000 Detection of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Consecutive Genital Samples Does Not Always Represent Persistent Infection as Determined by Molecular Variant Analysis J Clin Microbiol Septiembre 38(9) 3388-3393
 - 54 Mascareña, A Ortiz de la Peña, A Cruz, A Sams S 2006 Consenso de Vacunas Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Abril Junio 2007 20 (80) 1 7
 - 55 Meijer C Snijders P and Brule A (2000) Screening for cervical cancer Should we test for infection with high risk VPH? CMAJ Septiembre 5 163 (5)
 - 56 Melchers W Bakkers J Wang J Wilde P Boonstra, H Quint, W and Hansellar J 1999 Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papilloviruses types American Journal of Pathology Noviembre 155(5) 1473 1479
 - 57 Mendoza, J Muñoz M Téllez, L Vielma, S Mosquera, N Sabero P Quintero B 2007 Virus y Cáncer el ejemplo de los Papilomavirus Revista Médica de la Extensión Portuguesa. Octubre 8 3 (1) 133 144
 - 58 Middleton K Peh, W y Southern, S 2003 Organization of human papillomaviruses productive cycles during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers Journal of Virology 77 10186 10201
 - 59 Moscicki A Schiffman, M Kjaer S and Villa, L 2006 Chapter 5 Updating the natural history of HPV and anogenital cancer Vaccine Agosto 21 24 (3) S41 S52
 - 60 Muñoz N Bosch X Sanjosé S Herrero R Castellsagué X Shah K, Snijders P Meijer C for the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer The New England Journal of Medicine Febrero 6 6 (348) 518 527
 - 61 Muñoz N Castellsagué X Berrington de González A, Gissmann, L (2006) Chapter 1 VPH in the etiology of human cancer, Vaccine Agosto 21 (24) Supplement 3 1 10
 - 62 Muñoz N Méndez, F Posso H Molano M J C van den Brule A Ronderos M Meijer C y Muñoz A 2004 For the Instituto Nacional de Cancerología. VPH Study Group Incidence Duration, and Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Colombian Women with Normal Cytological Results The Journal of Infectious Diseases 190 2077 2087

- 63 O Farrell N y Egger M 2000 Circumcision in Men and the prevention of HIV infection a meta analysis revisited International Journal of STD and AIDS Marzo 2000 11(3) 137 142
- 64 Organización Premio Nobel (visto en linea 15 de noviembre de 2008)
<http://www.nobelpris.org/castellano/medizn/rous.htm>
- 65 Pagliusi S Dillner J Pawlita M Quint W Wheeler C y Ferguson M Chapter 23 International Standard reagents for harmonization of VPH serology and DNA assays—an update Vaccine Volumen 24 Suplemento 3 21 Agosto 2006 S193 S200
- 66 Parkin D y Bray F 2006 Chapter 2 The burden of VPH related cancers Vaccine 21 Agosto 24 (3) 11 25
- 67 Panamá en cifras 2003 Contraloría general de la Republica de Panamá.
- 68 Papilomatosis Laringea Recurrente Juvenil [en linea]
http://www.equidad.org.mx/ddeser/seminario/internas/lecturas/lect_its/vph.pdf
[Consulta 15 de Noviembre de 2008]
- 69 Parkin M y Bray F (2006) Chapter 2 The burden of VPH related cancers Vaccine (24) Agosto 21 Suplement3 S11 S25
- 70 Pérez, B y Pollán, M 2007 Incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix en España. Centro de estudio de epidemiología. 23 30
- 71 Pirog E Kleter B Olgac S Bobwielick, P Lindeman, J Quint, W Richard R and Isacson, C 2000 Prevalence of Human Papillomaviruses DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. American Journal of Pathology Octubre 154 (4) 1055 1062
- 72 Reeves W Brenes M Britton, R Quiróz, E Rawls W Valdés P de la Guardia, M E Cuevas M 1984 Aspectos Epidemiológicos del Cáncer Cérvico Uterino en la Republica de Panamá. Revista Médica de Panamá.9 (3) 123 135
- 73 Sahasrabuddhe V Mwanahamuntu M Vermund S Huh, W Lyon M Stringer S Parham D 2007 Prevalence and Distribution genotype among HIV infected in women in Zambia. British Journal of Cancer Abril 17 96 1480 1483
- 74 Schiffman, M Wheeler C y Castle Ph 2002 Human Papillomavirus DNA Remains Detectable Longer than Related Cervical Cytological Abnormalities for the Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group The Journal of Infectious Diseases 186 1169 1172
- 75 Schiller J and Nardelli Haefliger D 2006 Chapter 17 Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer Vaccine Agosto 21 24 (3) 147 153
- 76 Schwebke J 2005 Abnormal Vaginal Flora as a Biological Risk Factor for Acquisition of HIV Infection and Sexually Transmitted Diseases The Journal of Infectious Diseases 192 1315 1317
- 77 Shetty K Chattopadhyay A y Leigh, L 2005 Detection y typing of human papilloma virus in the oral mucosa of patients infected with human immunodeficiency virus Oral Oncology Noviembre 41(10) 311 315
- 78 Sellors J Karwalajtys T Kaczorowski J Mahony J Lytwyn A Chong S Sparrow J Lorincz A (2003) The Survey of VPH in Ontario Women (SHOW) Group 2003 Incidence clearance and predictors of human papillomavirus infection in women CMAJ February 18 168(4) 421–425

- 79 Sellors J Karwalajtys T Kaczorowski J Mahony J Lytwyn A Chong S Sparrow J Lorincz, A 2002 Prevalence of infection with carcinogenic human papillomavirus among older women. CMAJ October 15 167(8) 871-873
- 80 Sichero L Franco E y Villa, L 2005 Different p105 promoter activities among natural variant of human papillomavirus type 18 The Journal of Infection Disease Enero 191 739 742
- 81 Suárez, A Esquivias J Vidart, J y Picazo de la Garza, J 2006 Detección y tipificación mediante biología Molecular en muestras genitales Rev Española de Quimioterapia. Vol 19 (2) 161 166
- 82 Sukvirach, S 2003 Population based human papillomavirus prevalence in Lampang y Songkla, Thailand Journal of Infectious Diseases 187(8) 1246 1256
- 83 Tachezy R, Rector A Havelkova, M Wollants E Fitten, P Opdenakker G Jensen, B Sundberg J Van Ranst M 2002 Avian Papillomavirus the parrot *Psittacus erithacus* papillomavirus (PePV) genome has a unical organizational the early protein region and is phylogenetically related to the chaffinch Papillomavirus BMC Microbiology Julio 10 2 (1) 19 21
- 84 Tumores Malignos de la Republica de Panamá 1994 2004 MINSA (2006) http://www.minsa.gob.pa/informacion_de_salud/estadisticas_de_salud/tumores%20%20malignos%20en%20panama%201985_2004.pdf
- 85 Walboomers J Jacobs M Manos M Bosch, F X Kummer J Shah, K. Snijders P Peto J Meijer C Muñoz N 1999 Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide The Journal of Pathology Diciembre 189 (1) 12 19
- 86 Wright, T Bosch, F Franco E Cuzick, J Schiller J Garnett G and Meheus A 2006 Chapter 30 VPH vaccines and screening in the prevention of cervical cancer conclusions from a 2006 workshop of international experts Vaccine 21 Agosto 24 (3) 251 261
- 87 Worda, C Huber A Hudelist G Schatten C Leipold H Czerwenka, K y Eppel W 2005 Prevalence of Cervical y Intrauterine Human Papillomavirus Infection in the Thurd Trimester in Asymptomatic Women Journal of the Society for Gynecologic Investigation Septiembre 12 (6) 440-444
- 88 Zheng ZM Baker C 2006 Papillomavirus Genome Structure, Expression and Post Transcriptional regulation PMC Mayo 30 (11) 2286 2302

ANEXOS

Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
UNIDAD DE GENOMICA Y PROTEOMICA

Consentimiento Informado

El Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, a través de la Unidad de Genómica y Proteómica, está realizando un estudio para conocer la *Prevalencia de genotipos encontrados en muestras positivas para Virus Papiloma Humano en mujeres panameñas de 15 a 60 años* con el propósito de brindar un mejor manejo preventivo y curativo de lesiones potencialmente malignas. Este estudio se estará llevando a cabo entre los meses de Enero a Agosto de 2008.

Se me ha invitado voluntariamente a participar de esta investigación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Todas mis dudas e interrogantes fueron contestadas a mi entera satisfacción. Entiendo que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento sin que esto influya en mi atención en la clínica de patología cervical.

Entiendo que el beneficio que recibire será el de poder acceder a un examen de tipificación del virus del papiloma humano de manera gratuita y recibir toda la atención y tratamientos de acuerdo a las normas vigentes de patología cervical y colposcopia del Ministerio de Salud. La prueba de tipificación no me generará dolor o molestia alguna. Además he recibido orientación sobre prevención de Infecciones de Transmisión Sexual y un tríptico con recomendaciones si llegara a resultar positiva por algún subtipo de Virus del Papiloma Humano.

Toda la información proporcionada por mí para esta investigación es confidencial excepto para los investigadores de este estudio. Pero los datos podrán ser usados por el Instituto Conmemorativo Gorgas y el Ministerio de Salud sin contemplar mi nombre en las presentaciones ni informes que se presenten.

Si tiene alguna pregunta relacionada a la investigación, puede contactar a al Lic. Lina Solís de Calvit a los teléfonos 527-4811 Ext. 112.

Si tiene alguna pregunta relacionada con sus derechos contactar a la Dra. Ruth De León, Presidenta del Comité Nacional de Bioética de la Investigación a los teléfonos 507 5639 507-4842 507-4811 ext. 162.

Firma del investigador
Fecha ____/____/____

Firma de la participante
Fecha ____/____/____

4 Vivienda

Propia (1) ☐
 Alquilada (2) ☐
 Prestada (3) ☐
 Doméstica (4) ☐
 Otro (especifique) (5) _____

5 ¿Cuál es su raza

☐

Mestizo (1) ☐
 Negro (2) ☐
 Asiático (3) ☐
 Indígena (4) ☐
 Blanco (5) ☐
 Otros (especifique) (6) _____

6 ¿Ha fumado alguna vez? Sí (1) / No (2) ☐
 (Por lo menos cigarrillo al día por mes)

Si es afirmativo

6a. ¿Cuántos cigarrillos se fuma o fumaba usualmente por día?

6b. ¿A qué edad comenzó a fumar?

6c. ¿A qué edad dejó de fumar?
 (Si todavía fuma, coloque un 66)

6d. ¿Cuántos años ha fumado en total?

7 Ha utilizado la leña para cocinar Sí (1) / No (2) ☐

Si es afirmativo

7a. ¿Por cuántos años la ha utilizado?

7b. ¿Cuántos años tiene de no cocinar con leña?
 (Si todavía la usa, colocar 77)

8 ¿Cuando era niña, utilizaba leña para cocinar en su casa?

Sí (1) / No (2) ☐

9 ¿Ha estado alguna vez embarazada? Sí (1) / No (2) ☐

Si es afirmativo

9a. ¿A que edad quedo embarazada por primera vez?

9b. ¿Cuántos embarazos completos ha tenido usted?

9c. ¿Cuántos hijos tuvo antes de los 23 años?

(Si ninguno colocar 7)

9d. ¿Le han practicado alguna vez cesarea? Si (1) / No (2) ☐

Si es afirmativo

9 d 1. ¿Cuántas cesareas le han practicado?

9 d 2. ¿En que embarazo fue la primera cesárea?

10. Ha utilizado alguna vez

Anticonceptivos orales Si (1)/ No (2) ☐

10 a Inyección ☐

10 b Condones ☐

10 c Diafragmas ☐

10 d DIU ☐

10 e Espumas cremas ☐

10 f Cirugía ☐

(Edad de la paciente al operarse)

Otro (especifique) _____

(Si la respuesta es nunca, colocar 77 en la columna del año)

(Si utilizaba el método menor de un año colocar 78)

10 g. ¿Si utilizo anticonceptivos orales ó inyectables, a que edad comenzó?

A O

Iny

Si no utilizo el método colocar 77

11. ¿A que edad tuvo sexo con un hombre por primera vez?

12. ¿Con cuántos hombres ha tenido sexo durante toda su vida?

Incluya matrimonios y otros compañeros sexuales

1 (1) ☐

2 3 (2) ☐

4 5 (3) ☐

6 10 (4) ☐

11 20 (5) ☐

>20 (6) ☐

(Si ha tenido ninguno colocar 7)

12a. En caso de haber tenido más de 6 preguntar si ha ejercido servicios como trabajadora sexual ☐

Si (1)/ No (2)

12 b ¿Cambia con regularidad de pareja? Si (1)/ No (2)

(Si es 1 conteste la pregunta 12 c)

12 c Semana ☐

Mensual ☐

Anual ☐

12 d ¿Cuántas parejas ha tenido en los últimos 3 meses?

13 ¿Con cuántos hombres ha tenido sexo antes de los 20 años?

(Incluya matrimonio y otros compañeros sexuales)

1 (1)

2 3 (2)

4 5 (3)

6 10 (4)

11 20 (5)

>20 (6)

(Si no ha tenido ni g o colocar 7)

14 Usted ha tenido alguna vez

Flujo vaginal anormal Si (1)/ No (2) ☐

Úlcera ó verruga genital Si (1)/ No (2) ☐

14 a. Usted ha recibido tratamiento con

Si (1)/ No (2)

Óvulo ☐

Crema ☐

Inyección ☐

15 ¿Durante toda su vida, cuántos Papanicolau (tamizaje detector) se ha tomado?

(Excluya ésta consulta)

1 (1)

2 5 (2)

6 10 (3)

11 15 (4)

>15 (5)

Ninguna (7)

No sé si alguna vez me hicieron citología (8)

(De escoger ninguno pasar a la pregunta 17)

16 ¿Hace cuánto tiempo (en meses) le practicaron su última citología?

0 11	(1)
12 23	(2)
24 35	(3)
36 57	(4)
48 59	(5)
>60	(6)
No sé	(7)

17 ¿Alguna persona de su familia ha tenido cáncer?

☐

Cáncer de cérvix	(1)
Cáncer de ovario	(2)
Cáncer de mama	(3)
Cáncer de vulva	(4)
Cáncer de ano	(5)

ENCUESTA

1 En su opinión, la información obtenida se considera.

Confiable	(1)	<input type="checkbox"/>
No confiable	(2)	
Probablemente falsa	(3)	

2 La mujer entrevistada se comportó

Cooperativa	(1)	<input type="checkbox"/>
Desconfiada	(2)	
Sin querer contestar	(3)	

3 Entrevistador

Nombre

Firma _____

Cedula _____